

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE LOS CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.)**

**CABERNET SAUVIGNON Y MERLOT**

**PRESENTA**

**JAIME MANUEL CAVAZOS GALINDO**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**General Escobedo Nuevo León, México**

**Noviembre de 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE LOS CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.)**

**CABERNET SAUVIGNON Y MERLOT**

**PRESENTA**

**JAIME MANUEL CAVAZOS GALINDO**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**General Escobedo Nuevo León, México**

**Noviembre de 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**TESIS**

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE LOS CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.)**

**CABERNET SAUVIGNON Y MERLOT**

**PRESENTA**

**JAIME MANUEL CAVAZOS GALINDO**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**General Escobedo Nuevo León, México**

**Noviembre de 2017**

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL  
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
COMITÉ PARTICULAR**

---

**Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías**

**Director**

---

**Dr. José Argelio Santos Haliscak**

**Co-Director**

---

**Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez**

**Asesor**

## **DEDICATORIAS**

A mi esposa, Edith Adriana Leal Montalvo, quien me brindo su amor, su cariño, su estímulo y apoyo constante, en todo momento para hoy conseguir esta meta profesional.

A mis adorados hijos, Jaime y Daniela Edith, quienes me prestaron el tiempo que les pertenecía, dándome siempre su amor y comprensión para terminar mis tareas.

A mis padres, porque a lo largo de mi vida han sido un ejemplo a seguir, me han dado lo mejor y me han brindado siempre confianza y apoyo para realizarme en la vida, va dedicada con todo mi amor para ustedes, María de los Ángeles Galindo de Cavazos y Eloy Américo Cavazos Ramírez.

A mis hermanos Eloy y Mariángeles. Doy gracias a Dios por darme el privilegio de haber nacido en el mismo lugar y contar con ellos siempre en mi vida. Gracias por lo que hemos vivido juntos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a la Virgen María por ayudarme siempre en todo momento y llevarme de la mano por un camino adecuado para realizar mi posgrado.

A la Doctora Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías directora de tesis por todo su apoyo, paciencia y confianza en todo este tiempo que llevo de conocerla.

Al Dr. Omar G. Alvarado Gómez y al Dr. J. Argelio Santos Haliscak, por darme la oportunidad y su tiempo en todo momento para realizar el trabajo de investigación.

Al Dr. Gustavo Moreno Degollado y todos los que integran el Centro de Investigación en Producción Agropecuaria, por el apoyo recibido para finalizar esta tesis.

A todos los profesores que me impartieron clase durante mi posgrado, los cuales, compartiendo conmigo su tiempo y conocimiento. Mis respetos y admiración.

A todos mis compañeros de estudio, en especial a Alejandro Ibarra y Nimbe Carbajal, por su apoyo, consejo y amistad, lo cual me fue muy importante en los momentos más difíciles, para continuar con mi posgrado.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Unidad Marín, FAUANL, por las facilidades brindadas durante el desarrollo de esta investigación.

Al CONACYT por el apoyo económico para llevar a cabo esta investigación.

Finalmente, debo de agradecer a mi Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme dado la oportunidad de estudiar para la obtención de mi grado de Maestro en Ciencias.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIAS .....	viii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE CUADROS .....	xiv
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE .....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvi
ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMEN .....	xx
ABSTRACT .....	xxii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. HIPÓTESIS .....	3
1.3.1 Hipótesis General .....	3
1.3.2 Hipótesis específicos .....	3
1.4 OBJETIVO .....	4
1.4.1 Objetivo general.....	4
1.4.2 Objetivo específico.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5

2.1. Orígenes de la vid .....	5
2.1.1. Historia .....	5
2.1.2. Distribución .....	6
2.2. Clasificación taxonómica de <i>Vitis vinifera</i> .....	7
2.3. Ciclo biológico de la vid.....	8
2.3.1. Crecimiento de brotes, hojas y área foliar .....	8
2.3.2. Floración.....	8
2.3.3. Cuajado y formación de fruto.....	9
2.4. Variedades .....	10
2.4.1. Cabernet Sauvignon .....	11
2.4.2. Merlot.....	12
2.5. Importancia de la uva .....	12
2.5.1. Importancia Económica .....	12
2.5.2. Usos medicinales.....	13
2.6. Producción de vid.....	13
2.6.1. Mundial .....	13
2.6.2. Nacional.....	14
2.6.3. Nuevo León .....	15
2.7. Propagación tradicional de la uva. ....	15
2.8. Propagación con el uso de la Micropropagación.....	16



2.9.	Etapas de la Micropropagación .....	19
2.9.1.	Métodos de desinfección .....	20
2.9.2.	Establecimiento Aséptico.....	22
2.9.3.	Inducción de Brotes .....	23
2.9.4.	Medios de Cultivo para la inducción de brotes .....	24
2.9.5.	Multiplicación de brotes .....	26
2.9.6.	Enraizamiento.....	27
2.9.7.	Aclimatación .....	28
2.10.	Problemáticas de la Micropropagación .....	30
2.10.1.	Contaminación.....	30
2.10.2.	Oxidación.....	31
2.10.3.	Fenolización.....	33
2.10.4.	Dosis de hormonas y reguladores de crecimiento .....	34
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1.	Localización de área de estudio.....	37
3.2.	Selección de plantas en Campo.....	38
3.3.	Trabajo previo a la recolección del material vegetal.....	39
3.4.	Proceso de recolección del material vegetal .....	39
3.5.	Técnica de pre-desinfección de los explantes.....	40
3.6.	Técnica de desinfección.....	41

3.7.	Establecimiento aséptico <i>in vitro</i> de los explantes .....	42
3.8.	Inducción de brotes establecidos <i>in vitro</i> .....	45
3.9.	Etapas de Multiplicación de brotes .....	46
3.10.	Diseño experimental .....	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
4.1	Establecimiento Aséptico .....	50
4.1.1.	Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio.....	50
4.1.2.	Viabilidad de los explantes .....	54
4.2	Inducción de Brotes.....	56
4.2.1.	Número de brotes .....	56
4.2.2.	Longitud de brotes .....	58
4.3	Multiplicación de brotes y enraizamiento.....	59
4.3.1	Número y longitud de brotes.....	59
4.3.2	Porcentaje de enraizamiento .....	64
5.	CONCLUSIONES .....	65
6.	LITERATURA CONSULTADA .....	66
7.	APÉNDICE .....	81

## ÍNDICE DE CUADROS

### Página

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Vitis vinifera</i> según Fregoni (2005):.....	7
<b>Cuadro 2.</b> Principales estados productores de vid industrial, área cultivada y litros de vino estimado para México en el 2013 según CMV, 2014:.....	14
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de los principales reguladores de crecimiento.....	35
<b>Cuadro 4.</b> Identificación de plantas seleccionadas según su ubicación en campo...	39
<b>Cuadro 5.</b> Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962). ....	43
<b>Cuadro 6.</b> Componentes del medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (1981).	47
<b>Cuadro 7.</b> Medios de cultivo en la multiplicación de brotes. ....	48
<b>Cuadro 8.</b> Porcentaje de contaminación en explantes de vid ( <i>Vitis vinifera</i> L.) en dos tiempos al NaClO, después de cuatro semanas del establecimiento <i>in vitro</i> .....	51
<b>Cuadro 9.</b> Resultados de la prueba de ji Cuadrada para los cultivares de Cabernet Sauvignon y Merlot en los dos tipos de explantes de vid ( <i>Vitis vinifera</i> L.) .....	53
<b>Cuadro 10.</b> Efecto del NaClO a diferentes tiempos para medir la viabilidad en ambos explante de vid ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	55
<b>Cuadro 11.</b> Comparación de medias en la inducción de brotes en el medio MS para meristemas en ambos cultivares suplementado con tres concentraciones de BAP a las 8 semanas de subcultivos.....	57
<b>Cuadro 12.</b> Comparación de medias en la inducción de brotes en los medio MS para microestacas para ambos cultivares suplementado con tres	

concentraciones de reguladores de crecimiento BAP a las 8 semanas de subcultivos.....	59
<b>Cuadro 13.</b> Comparación de medias en las variables número y longitud de brotes a las ocho semanas del subcultivo de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot. ....	61
<b>Cuadro 14.</b> Comparación de medias en las variables número y longitud de raíces a las ocho semanas de subcultivos, en los cultivares .....	63
<b>Cuadro 15.</b> Porcentaje de enraizamiento de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot en los diferentes medios a las ocho semanas. ....	64

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1A.</b> Comparativo de porcentajes de viabilidad a las 4 semanas .....	81
<b>Cuadro 2A.</b> Efecto del NaClO a diferentes tiempos para medir la contaminación y viabilidad en porcentaje según explante .....	82
<b>Cuadro 3A.</b> Prueba de Ji-Cuadrada y significancia para las variables contaminación y viabilidad a las 4 semanas .....	83

<b>Cuadro 4A.</b> Inducción de brotes en el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP las 8 semanas de subcultivos.....	83
<b>Cuadro 5A.</b> Datos para la inducción de microestacas para número de brotes, longitud de brotes y número de hojas para el cultivar Cabernet Sauvignon a las 8 semanas.....	84
<b>Cuadro 6A.</b> Datos para la inducción de microestacas para número de brotes, longitud de brotes y número de hojas para el cultivar Merlot .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Lugar de recolección del material vegetal en el Municipio de Linares, Nuevo León .....	37
<b>Figura 2.</b> Centro de Investigación en Producción Agropecuaria en Linares, Nuevo León. ....	37
<b>Figura 3.</b> Laboratorio de Biotecnología Vegetal unidad Marín, en Marín N.L. ....	38
<b>Figura 4.</b> Proceso de evaluación de planta en campo e identificación para ser llevado al laboratorio, a) planta en campo, b) evaluación del estado de las yemas, c) estacas identificadas según cultivar y planta en campo. ....	40

Figura 5. Selección en el laboratorio de yemas a utilizarse (a), pasadas por una solución bactericida-fungicida (b), para terminar con tres enjuagues con agua bidestilada (c). .....	41
Figura 6. Desinfección de yemas axilares de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot, en la campana de flujo laminar, previo a su establecimiento en el medio MS.....	42
Figura 7. Establecimiento aséptico en el medio MS con meristemos ( a. Merlot y b. Cabernet Sauvignon) y yemas axilares (c. Merlot y d. Cabernet Sauvignon).....	44
Figura 8. Inducción de brotes en el medio MS de meristemos (a. cultivar Merlot y b. cultivar Cabernet Sauvignon) y yemas axilares (c Merlot y d Cabernet Sauvignon).....	46
Figura 9. Contaminación de yemas axilares de los cultivares Cabernet Sauvignon ( a bacteria y b hongo) y Merlot ( c y d hongo) a las 4 semanas de establecido.....	52
Figura 10. Respuesta de los cultivares Cabernet Sauvignon al Medio MS adicionado con 1.5 mg L <sup>-1</sup> de BAP después de 8 semanas.....	57
<b>Figura 11.</b> Respuesta del los cultivar Cabernet Sauvignon y Merlot en medio de cultivo MS AL 50 % adicionado con 1 mg L <sup>-1</sup> de BAP, a las 8 semanas del subcultivo a este medio. ....	61
<b>Figura 12.</b> Formación de raíces en explantes de: a) cultivar Merlot en el medio MS al 50% y 0.5mg L <sup>-1</sup> de BAP, b) cultivar Cabernet Sauvignon en el medio MS al 50% adicionado con 1.0 mg L <sup>-1</sup> de BAP, después de 8 semanas. ....	63

## ABREVIATURAS

MS	Medio Murashige y Skoog
B5	Medio Gamborg
WPM	Medio Woody Plant Medium
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido indolacético
AG <sub>3</sub>	Ácido giberélico
BAP	6-bencilaminopurina
CH	Caseína hidrolizada
CA	Carbón activado
NaClO	Hipoclorito de sodio
PVP	Polivinilpirrolidona
Tween-20	Polisorbato 20
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligramo
G	Gramo
kg	Kilogramo
ton	Tonelada
s	Segundo
min	Minuto
hr	Hora
mm	Milímetro

cm	Centímetro
ha	Hectárea
$\mu\text{M}$	Micromolar
mM	Milimolar
$\text{mL L}^{-1}$	Mililitro por litro
$\text{mg L}^{-1}$	Miligramo por litro
$\text{g L}^{-1}$	Gramo por litro
$\text{kg cm}^{-2}$	Kilogramo por centímetro cuadrado
$\text{ton ha}^{-1}$	Tonelada por hectárea
v/v	Volumen sobre volumen
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
%	Porcentaje
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
DMS	Diferencia Mínima Significativa
$\chi^2$	Ji-cuadrada
Cv	Cultivar



## RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo de importancia económica, reconocido por su aporte de antioxidantes como el resveratrol. El crecimiento de la vitivinicultura en México, ha llevado a aplicar estrategias para la multiplicación del cultivo, por medio de acodos aéreos o terrestres e injertos, sin embargo, esto implica tener material base (plantas madres) que permitan la aplicación de estas técnicas. Hoy en día, la Biotecnología Vegetal es una herramienta útil que se puede utilizar con éxito en muchos cultivos y garantiza la obtención de plantas libres de patógenos, en corto tiempo y con el vigor de la planta madre.

El objetivo de la presente investigación fue Inducir la organogénesis de yemas axilares y meristemos apicales de vid (*Vitis vinifera* L.) de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot, además de su multiplicación y enraizamiento.

La inducción de brotes en ambos cultivares se indujo en el medio MS adicionado con 0.5, 1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, cuantificándose el número y longitud de sus brotes, para meristemos y microestacas para ambos cultivares. Después de 8 semanas se obtuvieron promedios de 1.88 y 2.37 brotes, respectivamente en el medio dos. Mientras que para la longitud de brotes el promedio fue de 2.15 y 2.45 cm en ambos cultivares y mismo medio.

En la etapa de multiplicación se evaluaron los medios MS al 50 y 100 % de sus sales adicionados con 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP y WPM con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Las variables evaluadas fueron: número y longitud de brotes, en ambos cultivares donde la mejor respuesta se obtuvo en el medio MS 50% + BAP 1.0 mg L<sup>-1</sup> con 6.37 brotes

y 2.72 cm de longitud de brotes después de ocho semanas. En esta misma etapa se presentó el enraizamiento por lo que se evaluó el número de raíces y su longitud, siendo el medio MS al 50% adicionado con 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, los que presentaron los mayores valores con 3.81 y 4.06 raíces con una longitud de raíces promedio de 2.70 y 3.34 cm.

## ABSTRACT

The grapevine (*Vitis vinifera* L.) is an economically important crops, recognized for its contribution of antioxidants as resveratrol. The growth of viticulture in México has led the application of strategies for the development of the crop, by means of aerial or terrestrial layers and grafts, but this implies having basic material (mother plants) that allow the development of these techniques. So, today, plant biotechnology is a useful tool that can be used today successfully in many crops and ensures the production of pathogen free plants in a short time and with the vigor of a mother plant.

The objective of the present research was to induce the organogenesis of axillary buds and apical meristems of grapevine (*Vitis vinifera* L.) of the cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot.

The induction in both cultivars was tested in the MS medium added with 0.5, 1.0 and 1.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP, evaluating the number and length of their shoots, for meristems and axillary buds for both cultivars. After 8 weeks, we obtained averages of 1.88 and 2.37 shoots respectively in the medium number two. For the shoot length, the average was 2.15 and 2.45 cm in both cultivars and the same medium.

In the multiplication stage, the MS medium was evaluated al 50% and 100% of strength added with 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP and WPM plus 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP. The variables evaluated were: number and length of shoots, in both cultivars the response in the medium MS 50% + BAP 1.0 mg L<sup>-1</sup> was 6.37 shoots and 2.72 cm shoot length after eight weeks. In the same stage, rooting was present , thereby the number of roots and roots length were evaluated, the MS medium at 50% added with 0.5 and

1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP, presented the highest values with 3.81 and 4.06 roots and in length of roots with 2.70 and 3.34 cm.

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los cultivos más antiguos y de mayor importancia económica del mundo es la vid *Vitis vinifera* L. (Marković, 2013; Borja-Bravo *et al.*, 2016). Procedente de Asia, se cultiva en todas las regiones templadas. El producto principal derivado de sus frutos, el vino, fue considerado divino, una bebida de los dioses. Además de la elaboración de vino y otras bebidas alcohólicas, sus bayas se utilizan para consumo en fresco (uva de mesa) o pacificadas, y para la obtención de jugos (Lazo *et al.*, 2016). En la industria farmacéutica, la uva contiene una amplia cantidad de antioxidantes como el resveratrol, el cual ha sido positivamente relacionado en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, diabetes, enfermedades del corazón y nerviosas, infecciones virales y Alzheimer (Singh *et al.*, 2011).

El cultivo de la vid es una actividad de gran importancia económica a nivel mundial. En el año 2015 se cultivaron más de 7.5 millones de ha de vid en el mundo, los cuales produjeron 274.4 Mill. de hectolitros (hl), en donde se comenta que el consumo de vino se ha estabilizado y se estima en 240 Mill. hl (OIV, 2016).

Europa es el mayor productor de uva con el 44% de la producción mundial. La lista de los países europeos productores de uva está encabezada por Italia, Francia y España. En el caso de España, el cultivo tiene gran importancia, considerando que representa el 11% de las explotaciones agrarias nacionales, con una población activa dedicada de 96,000 personas en 2007 (INE, 2008).

En México se reportan 19 estados (entre ellos Nuevo León) que se dedican a la producción de uva, durante el periodo 2002-2011, en promedio se sembraron 31.4

mil ha de uva. El estado de Baja California Norte, es principal productor de esta fruta, y acapara el 30% de la producción nacional; otros tres estados con producción relevante son Zacatecas, Sonora y Aguascalientes (SAGARPA, 2011).

Durante la última década, en México, la demanda de vino tanto nacional como internacional ha crecido un 12% anual, sin embargo, la mayoría proviene del mercado de vinos importados. El consumo anual nacional pasó de 27 millones de litros en el 2000 a 70 millones en 2013 (CMV, 2013).

### **1.1. Justificación**

Debido al crecimiento que ha tenido la vitivinicultura en México, es necesario desarrollar estrategias que contribuyan al desarrollo del cultivo, entre ellas la relacionada con la propagación, la cual tradicionalmente se realiza mediante acodos aéreos o terrestres, e injertos, sin embargo, esto implica tener material base (plantas madres) que permitan el desarrollo de estas técnicas. Actualmente productores nacionales recurren a la importación del material, lo que eleva los costos en la inversión para la plantación de nuevas áreas, además de que el material no viene certificado libre de virus. Por lo que; el uso de la biotecnología vegetal a través del cultivo *in vitro* pudiera ser una alternativa para quienes deseen multiplicar plantas libres de patógenos, en un corto tiempo y con el vigor de una planta madre.

A pesar de que el sistema de propagación de la vid permite la conservación y pureza de la diversidad genética, la micropropagación asegura dicha conservación en condiciones controladas como una alternativa antes desastres naturales en campo.

## **1.2. HIPÓTESIS**

### **1.3.1 Hipótesis General**

La organogénesis de la vid (*Vitis vinifera* L.) en los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot bajo condiciones *in vitro* se logra mediante la aplicación de combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo.

### **1.3.2 Hipótesis específicos**

1.- La concentración del agente desinfectante y el tiempo de exposición a este permitirán un establecimiento aséptico adecuado en los explantes de vid.

2.- La inducción y multiplicación de brotes en vid se logra mediante la combinación de reguladores de crecimiento y suplementos adicionados al medio de cultivo.

## **1.4 OBJETIVO**

### **1.4.1 Objetivo general**

Inducir la organogénesis de yemas axilares y meristemos apicales de vid (*Vitis vinifera* L.) de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot cultivados *in vitro*.

### **1.4.2 Objetivo específico**

- Establecer una metodología para el establecimiento aséptico y la organogénesis de explantes de vid (*Vitis vinifera* L.) de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot.
- Definir el medio de cultivo más adecuado para el establecimiento *in vitro* de vid, de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot.
- Determinar la combinación óptima de reguladores de crecimiento para inducir la organogénesis y multiplicación de los cultivares de vid Cabernet Sauvignon y Merlot.



## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Orígenes de la vid**

Las primeras formas de vid aparecieron hace aproximadamente 6,000 años. La vid en estado silvestre era una liana dioica que crecía, durante la Era Terciaria, apoyada sobre los árboles del bosque templado del Círculo Polar ártico. Así aparece el *Vitis vinifera* que es la forma más antigua de hoja quinquelobulada, el *V. salyorum* de hoja no recortada y el *V. teutónica*, posteriormente en la Era Cuaternaria tenemos fósiles del *V. aussoniae* y el *V. vinifera* (Martínez de Toda y Sancha, 1997).

#### **2.1.1. Historia**

Los primeros datos que se han recogido sobre el cultivo de la vid se sitúa en Egipto, en la Biblia se cita a la vid asociándola siempre a la tierra fértil. No obstante, los verdaderos impulsores del cultivo de la vid fueron los iberos y los celtas, hacia el año 500 A.C (Columela, 1959), aunque fue posteriormente consolidado por los fenicios y sobre todo por los romanos (OIV, 1992), siendo ambas poblaciones procedentes del mediterráneo oriental, cuna de origen del cultivo. El cultivo de la vid para los fenicios gozaba de tanta importancia que en sus monedas imprimían un racimo de uvas.

Durante el periodo visigótico se siguieron plantando viñas (Salazar, 1985) teniéndose noticias de que durante la Edad Media se cultivaron especies del grupo de las “Pónticas” así como las “Occidentalis”, como lo demuestran los numerosos bajo relieves que existen en los monasterios. A partir del s. XVI, el cultivo de la vid gozó de gran importancia, de ahí que de estos periodos daten los pioneros de la ampelografía española (Dettweiler *et al.*, 2000).

### **2.1.2. Distribución**

El origen de la actividad vitivinícola se remonta a más de 5,000 años A.C. en Oriente Medio y en el sector más Oriental del Mar Mediterráneo donde se cultiva, gracias a su clima. Con el avance de los diferentes pueblos que habitaban el Mediterráneo, al igual que su tradiciones, cultura y arquitectura, se fueron trasladando las costumbres, y con ello el consumo del vino (Albiac, 2015).

La tradición vitivinícola en México se remonta a la época de la colonia. Sin embargo, en el continente americano existían vides silvestres mucho antes de la llegada de los europeos, como por ejemplo *Vitis rupestris*, *Vitis labrusca*, *Vitis berlandieri* y la uva cimarrona que los pueblos nativos consumían en su dieta regular tanto en México como en Estados Unidos (Bernaldez y Olguin, 2012).

Los Jesuitas, Dominicos y Franciscanos sembraron vides en sus diferentes misiones para producir vino para consumo personal y para sus actos litúrgicos. En 1593, Francisco Urdiñola estableció la primera bodega de vino en el Valle de Parras, Coahuila, creándose así el primer vino en América con fines comerciales (Cruz, 2003). La calidad y cantidad de los vinos producidos en México ocasionó que en 1595 se expidiera una ordenanza real prohibiendo el cultivo de vid para la producción de vino, sin embargo, los misioneros siguieron con su producción. A pesar de esta prohibición, el 18 de agosto de 1597 Don Lorenzo García estableció la bodega San Lorenzo en Parras, Coahuila, conocida ahora como la Casa Madero. El mismo cura Hidalgo y Costilla, promovió a principios del siglo XIX el cultivo de la vid en la Parroquia de Dolores; sin embargo, dada la prohibición de la Real Audiencia Española, los cultivos fueron destruidos (Cavazos *et al.*, 2012).

La producción de vino se vio seriamente afectada por los diferentes conflictos armados, desde la guerra de independencia hasta la revolución; solo se registran esfuerzos aislados: el de Bodegas Ferriño en Cuatro Ciénegas, Coahuila, los promovidos por Porfirio Díaz o el de los rusos Molokánes que iniciaron el cultivo de la vid en 1906 en el Valle de Guadalupe. A partir de 1948 se produjo un nuevo giro que condujo a la consolidación de la vitivinicultura mexicana creándose la Asociación Nacional de Vitivinicultura. (Ortiz, 2012).

## 2.2. Clasificación taxonómica de *Vitis vinifera*

El género *Vitis* comprende alrededor de 40 especies asiáticas, y cerca de 30 especies americanas, pertenecientes a dos subgéneros *Muscadinia* (cuenta con un patrimonio cromosómico de  $2n=40$ ) y comprende las especies (*Vitis rotundifolia*, *Vitis vinifera*, *Vitis munsoniana*, *Vitis popenoei*); y *Vitis* (cuenta con un patrimonio cromosómico de  $2n=38$ ) (Cuadro 1) (Fregoni, 2005).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *Vitis vinifera* según Fregoni (2005):

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Rhamnales</i>
Familia	<i>Ampelidacea</i>
Genero	<i>Vitis</i>
Especie	<i>Vitis vinifera</i>

### **2.3. Ciclo biológico de la vid**

Está representado por el crecimiento y desarrollo de los órganos vegetativos (raíces, pámpanos, hojas, zarcillos, nietos, chupones), se incluye dentro de este ciclo el almacenamiento de sustancias de reserva (agostamiento) y el inicio al reposo o dormición de yemas (Reynier, 1995).

#### **2.3.1. Crecimiento de brotes, hojas y área foliar**

El crecimiento vegetativo de la vid se representa mediante una curva tipo sigmoideal, ya sea en el tiempo cronológico o en tiempo fisiológico. El control del crecimiento se debe a un cambio en el equilibrio entre estimuladores e inhibidores endógenos en respuesta al ambiente y al propio estado de desarrollo de la planta (Rivera y Devoto, 2003). La proporción de ácido indolacético (AIA) y citoquinina por sobre el ácido abscísico (ABA) y algún fenol puede regular la actividad de división celular en el ápice, especialmente al inicio de crecimiento; el ácido giberélico, superando el efecto del ABA, sería el factor preponderante de la extensión de los entrenudos mientras que una declinación de los promotores, con aumento, o no, de ABA, estaría relacionado con el término del crecimiento (Gil, 1997).

#### **2.3.2. Floración**

La fertilidad de las yemas representa la exteriorización de su iniciación floral, resultante de la acción de factores externos e internos, ligados a la planta. La iniciación floral es el resultado de dos fenómenos distintos (Salazar y Melgarejo, 2005): el primero es la inducción floral, que es el fenómeno fisiológico que determina la diferenciación de un meristemo hacia la constitución de una inflorescencia, y el

segundo es, la iniciación floral, propiamente dicha, que es el fenómeno morfológico de la diferenciación de la inflorescencia y de las flores.

Según Coombe (1995), el inicio de la floración corresponde al momento en que la caliptra comienza a caer y coincide aproximadamente con 16 hojas separadas en el brote. La floración tiene su origen y desarrollo inicial dentro de la yema fructífera a partir del primordio no diferenciado en la temporada anterior a la cosecha. El número de primordios florales desarrollados en cada yema depende de la variedad, de la juvenilidad, del vigor, de la nutrición, del nivel de carbohidratos, de los reguladores de crecimiento, del estrés hídrico y de los factores climáticos. La producción de citoquininas también se ve favorecida por la alta temperatura (Gil, 2000). Este tipo de fitorreguladores son inductores de la floración y la proporción de ellas con las sustancias antagónicas. Por tanto, la giberelina, determina la iniciación floral. Esta hormona es inductora de la floración y la proporción de ella con la de su antagónica, giberelina, determina la iniciación de flores.

### **2.3.3. Cuajado y formación de fruto**

Según Coombe (1995), este estado se identifica cuando las bayas sobrepasan los 2 mm de diámetro y coincide con el momento en que el racimo está formando un ángulo de 90° con el brote.

Hardie y Anggenbach (1996), determinaron que el desarrollo de la semilla depende de diferencias entre las temporadas de crecimiento, diferencias del lugar de crecimiento, origen clonal, riego durante y después de floración y cambios importantes que influyan en sistemas de conducción, poda y manejo de la canopia.

Los factores climáticos influyen significativamente el cuajado de frutos. Debido a la inhibición del crecimiento del tubo polínico y al del desarrollo del óvulo, el cuajado disminuye significativamente con temperaturas inferiores a 18.3°C y superiores a 37.8°C. Bajas temperaturas, lluvias y alta humedad imposibilitan el desprendimiento de las caliptras. Además, las lluvias diluyen los fluidos del estigma lo que perjudica la adhesión de los granos de polen. La intensidad de luz es otro factor que influye en el porcentaje del cuajado. Ebadí *et al.*, (1996), quienes estudiaron el efecto de la temperatura y sombra sobre la floración, demostraron que el sombreamiento disminuye el porcentaje de frutos cuajados.

La abscisión de flores y frutos pequeños se inicia normalmente con la floración y finaliza dos semanas luego de la floración. La zona de abscisión es la base de cada pedicelo floral. Un factor importante en la caída de frutos es el etileno que actúa en la zona de abscisión estimulando la síntesis de hidrolasas. El ACC (1-ácido aminociclopropano-1-carboxílico), un precursor metabólico del etileno, también provoca la abscisión de frutos (Bessis *et al.*, 2000).

## **2.4. Variedades**

Existen alrededor de 5,000 variedades o cepas en todo el mundo, pero solo unas 30 se explotan comercialmente. Se dividen en blancas y tintas, produciendo vinos en esas dos categorías. Debido a que la pulpa en ambos casos es verdosa, la coloración se debe por el contacto del jugo con la cáscara u hollejo (Sabogal, 2007).

Como consecuencia de las características morfológicas de los racimos y de las bayas, las variedades tienen diferente vocación vitícola, dependiendo de su grosor,

forma de baya, el espesor del hollejo, la consistencia de la pulpa, el número de semillas, y en función del destino de las uvas, (Roa y Torres, 2012), se distinguen varias categorías de variedades según Reynier (2001):

- Las variedades para vino, pueden ser: Garnacha, Merlot, Syrah, Cariñena, Cabernet Sauvignon, Gamay, Chardonnay, entre otras.
- Las variedades de mesa, con bayas bastante gruesas, pulpa crujiente y de piel resistente, Dattier de Beyrouth, Italia, Cardinal, entre otras.

#### **2.4.1. Cabernet Sauvignon**

Originaria del Medoc francés, se considera el cepaje número uno de los racimos tintos en el mundo (Reynier, 1995), la variedad se ha difundido por áreas templadas-cálidas de todo el mundo. Salazar y Melgarejo (2005) describieron sus racimos como pequeños a muy pequeños de capacidad media, con bayas redondas pequeñas y con epidermis muy gruesa, azulada, con abundante pruina, muy jugosa de sabor y aroma peculiar.

Algunas características mencionadas en el catálogo general de las variedades y los clones de uva de vino y mesa hecha por Vivai Cooperativi Rauscedo (2013) algunas características de esta uva son las siguientes:

Variedad homogénea, las diferencias se refieren a la forma del racimo y al vigor, sus cepas medianamente vigorosas, sarmientos tendencialmente elevados, no acepta suelos fértiles, ni húmedos que inducen en la planta a una escasa lignificación y climas con insuficiente integral térmica. Se adapta a diferentes tipos de podas,

dependiendo de los ambientes. Resulta muy importante realizar operaciones en verde para crear un justo equilibrio entre la vegetación y la producción. Su brotación es tardía, la época de maduración es media y la producción se considera media y constante.

#### **2.4.2. Merlot**

Es una cepa tradicional en el Bordelés Francés, se caracteriza por sus hojas redondas y pentalobadas, con los bordes de los lóbulos superiores superpuestos dejando senos laterales perforados y con dientes en la base. Los racimos son sueltos y alargados con bayas pequeñas y oscuras (Alcalde, 1989).

Es usualmente descrito como levemente vegetal, similar al Cabernet Sauvignon, pero más frutal cuando la uva está madura y con menor cantidad de taninos, menos astringente y de envejecimiento más rápido (Catania y Avagnina, 2007). Posee gran cantidad de antocianas copigmentadas (Boulton, 1999).

### **2.5.Importancia de la uva**

#### **2.5.1. Importancia Económica**

Los viñedos son unos de los cultivos esenciales en la economía agraria de un gran número de países europeos junto con los cereales. La industria vínica y la viticultura constituyen un motor económico muy importante en el desarrollo rural de muchos municipios del Viejo Continente que con el paso de los años han ido adquiriendo gran fama con espacios productores de vino (Fernández, 2013).



### **2.5.2. Usos medicinales**

Los polifenoles son los fitoquímicos más importantes que se encuentran en la uva que posee muchas actividades biológicas y beneficios que promueven la salud (Shrikhande, 2000). Los compuestos fenólicos incluyen principalmente antocianinas, flavonoides, resveratrol y ácidos fenólicos (Novaka *et al.*, 2008; Jaladet *et al.*, 2009). Estos compuestos se han reportado con efectos farmacológicos como: anti-cáncer, efectos anti-obesidad, las propiedades anti-inflamatorias, promueven la salud del corazón, apoya la inmunidad y fortalece los huesos (Jaladet *et al.*, 2009).

Waterhouse (1994) investigador de la Universidad de California comento que el vino es una de las mejores fuentes de polifenoles y de antioxidantes disponible para los humanos. Curhan *et al.* (1996) informaron que el vino tinto reduce un 39 % el riesgo de padecer cálculos renales.

## **2.6. Producción de vid**

### **2.6.1. Mundial**

Según la Organización Internacional para la uva y el vino (2011), el consumo mundial de vino alcanzó el nivel de 244 Mhl, lo que supuso un leve aumento de 1.6 Mhl con respecto al 2010. En el continente africano, hubo un aumento del 5 % en comparación al 2010 con un consumo de 7.6 Mhl, países como Angola, Sudáfrica y Túnez sobresalieron para alcanzar estas cifras. Por su parte en América consumió 53 Mhl, 1.2 % más que lo consumido en el 2010, En donde destaco Estados Unidos como el segundo mayor consumidor de vino en el mundo. En Asia el consumo aumentó un 7% en comparación al 2010 con 21.8 Mhl de vino, siendo el tercer mayor

consumidor continental de vino del mundo, siendo China el mayor impulsador del crecimiento del continente, seguido de Turquía y Japón. En Europa el consumo tuvo tendencia a la baja con 155.8 Mhl, siendo el principal consumidor mundial con el 64% en el 2011, siendo lo mayores consumidores Francia, Alemania, España, Italia y Reino Unido.

### **2.6.2. Nacional**

La producción en México representa menos del 1% a nivel mundial (Márquez, 2004), la producción se concentra en algunos estados del país (Cuadro 2), en donde están establecida más de tres mil cuatrocientas hectáreas cultivadas, estimando una producción de vino para el 2014 de más de 19 millones de litros, según el Consejo Mexicano Vitivinícola A.C. (2014), distribuidos en diferentes estados del país.

**Cuadro 2.** Principales estados productores de vid industrial, área cultivada y litros de vino estimado para México en el 2013 según CMV, 2014:

<b>Estado</b>	<b>Hectáreas en producción</b>	<b>Litros de vino estimada</b>
Aguascalientes	110	570,370
Baja California	2400	13,333,333
Coahuila	415	2,459,259
Chihuahua	120	666,667
Guanajuato	50	259,259
Querétaro	285	1,583,333
Zacatecas	60	311,111

### **2.6.3. Nuevo León**

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en su página oficial, informo que hasta el 2015, Nuevo León contaba con 32 hectáreas dedicadas al cultivo de la uva, con una superficie cosechada de 22 hectáreas y una producción de 125 ton ha<sup>-1</sup>, teniendo un rendimiento de 5.68 ton ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2015).

Actualmente la Conferencia Nacional de Gobernadores (CONAGO), por medio de la Comisión de Fomento a la Industria Vitivinícola (CFIV), está realizando mesas de trabajo con el fin de impulsar la vitivinicultura en Nuevo León, en donde participan viñedos como Las Maravillas, de García N.L., Valle de Linares, de Linares N.L., y la Universidad Autónoma de Nuevo León, además de otros pequeños productores interesados en el cultivo (CFIV, 2016).

### **2.7. Propagación tradicional de la uva.**

La uva tradicionalmente se propaga de manera vegetativa mediante acodos, ya sea aéreos o terrestres, e injertos, aunque las estacas leñosas maduras, se usan con mayor frecuencia para producir estacas arraigadas, para la propagación masiva de árboles femeninos de variedades selectas (Kartman y Kester, 1995). Otra forma es a través de estacas de madera dormante (36 a 46 cm de largo) recolectadas durante el invierno. Estas son plantadas durante la primavera en contenedores, para posteriormente ser trasplantadas a la viña. Este es un proceso lento y limitado por estacionalidad para la propagación de nuevos cultivares, y la introducción de nuevas especies exóticas (Thomas y Schiefelbein, 2001).

## 2.8. Propagación con el uso de la Micropropagación

Del latín *totuspotens*: *totus* (todo) y *potens* (poder o habilidad), el término célula totipotencial, es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a diferentes tipos celulares, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos e incluso embriones (Tobar, 2011).

La ciencia de cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología las cuales los microorganismos se hacen en medios estériles para su producción e identificación (Salazar, 2010).

El cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, una parte separada del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos, se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas. Cada fragmento origina una planta idéntica a aquella de donde se tomó el fragmento, aunque, también puede ser modificada genéticamente para tener variedades artificiales (Mroginski *et al.*, 2010).

Parte del cultivo de tejidos es la micropropagación *in vitro*, la cual es el conjunto de técnicas para obtener plantas asexuales en forma rápida, eficiente, libres de enfermedades y en grandes cantidades, para la cual se debe de contar con un laboratorio de micropropagación de tejidos vegetales con instalaciones, equipo y los reactivos necesarios para la realización de la investigación en diferentes tipos de plantas, permitiendo generar nuevos protocolos de micropropagación de plantas *in vitro*, que logren una propagación masiva y libre de enfermedades (Ramos, 2012).

Se están tomando diversas medidas para la conservación de germoplasma como es el almacenamiento de semillas de plantas con alto valor para la humanidad. La biotecnología ofrece una amplia gama de técnicas de preservación (Villalobos y Engelmann, 1995). La regeneración se puede lograr por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática. La primera vía es la más clásica, habiéndose publicado cientos de trabajos desde los inicios del cultivo *in vitro*. Los métodos biotecnológicos como es el caso del cultivo de tejidos vegetales que ha sido utilizado con éxito en diversos países del mundo y que ha logrado desplazar poco a poco los sistemas tradicionales de producción de plántulas (Melyan *et al.*, 2015). Entre las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales, se puede mencionar la micropropagación o clonación *in vitro* (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende una serie de técnicas mediante las cuales un explante (porción de tejido o de un órgano que se retira del resto de la planta) se cultiva en un medio de composición química definida en condiciones ambientales controladas (Razdan, 2003). Se aplica a todo cultivo bajo cristal en medio aséptico, pero incluye diversas técnicas cuyos métodos y fines son muy diferentes. La técnica general consiste en tomar un fragmento de tejido vegetal, colocarlo en un medio nutritivo y provocar (gracias a un equilibrio adecuado de los elementos del medio) directamente o tras manipulación el desarrollo de una plántula. El conjunto de estas operaciones se desarrolla en condiciones estériles y se seguirá por una aclimatación en medio tradicional (Boutherin y Born, 1994).

Para la obtención de buenos resultados en la obtención de plantas *in vitro* es importante tener en cuenta los reguladores de crecimiento (Agüero *et al.*, 2000;

Nookaraju *et al.*, 2007); las variedades de uva utilizadas (Hewstone *et al.*, 2006); la intensidad y tipo de poda (Ponce *et al.*, 2009); genotipo, época de cosecha (Ramming y Emershad, 1990; Pommer *et al.*, 1995) además de los medios y tiempos de cultivo utilizados *in vitro* (Valdez, 2005).

La aplicación del cultivo *in vitro* de plantas según Salazar (2010) son:

- Multiplicación masiva de plantas para especies de difícil propagación por otros métodos.
- Rescate de especies en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas especiales.
- Producción de semillas sintéticas.
- Producción de plantas libres de enfermedades (obtención de plantas libres de virus). Producción de nuevos híbridos.
- Germinación de semillas.
- Generación de variabilidad en mejora genética (Incluyendo la obtención de plantas transgénicas).
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población).

Ventajas de la multiplicación *in vitro* según Salazar (2010) son:

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala

- Uniformidad del material obtenido.
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales.
- Reducción del tiempo de multiplicación y del espacio requerido para tal fin.
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado.
- Introducción rápida de nuevos cultivares.
- Conservación de germoplasma en condiciones seguras.
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal.

La micropropagación en vid, ha ofrecido un gran potencial para su multiplicación en cuanto a rapidez y la posibilidad de guardar stock de cultivos durante años, sin la pérdida de potencial de multiplicación (Thomas y Schiefelbein, 2001).

## **2.9. Etapas de la Micropropagación**

La micropropagación de cualquier especie vegetal es un proceso en el que podemos distinguir generalmente 5 fases o etapas: Etapa 0: selección de la planta madre y preparación; Etapa I: inicio del cultivo; Etapa II: multiplicación; Etapa III: elongación y enraizamiento; Etapa IV: aclimatación. La primera propuesta realizada para sistematizar el diseño de los protocolos de micropropagación se debió al Dr. Murashige e inicialmente contemplaba las etapas I, II Y III. Posteriormente se aceptó la sugerencia realizada por Maene y Debergh, de añadir una etapa previa, a la cual se denominó Etapa 0 porque incluía actuaciones a tener en cuenta antes de abordar

la Etapa I. Más recientemente se incluyó una etapa final, la etapa IV, correspondiente a la transferencia de la planta a condiciones ambientales “naturales” (George *et al.*, 2008).

### **2.9.1. Métodos de desinfección**

Una parte importante del proceso de inicio de la micropropagación es la desinfección las plantas donadoras, las cuales se deben de someter a una desinfección superficial, con el fin de eliminar los microorganismos que pudieran competir con el crecimiento y desarrollo de explantes en condiciones *in vitro*, por lo que se debe utilizar productos químicos (Debergh y Zimmerman, 1991).

Hartmann y Kester (1997) comentan que los productos químicos más utilizados es el etanol (50%) debido a que posee una baja tensión superficial y puede fácilmente humedecer el tejido; hipoclorito de sodio (NaClO) y el hipoclorito de calcio (CaClO). El NaClO se utiliza con mayor frecuencia, en diluciones a concentraciones de 2 a 3.5% y tiempos de desinfección que no afecten el tejido, seguido de lavados (3 a 5 veces) con agua destilada estéril, con el fin de eliminar residuos de desinfectantes que puedan inhibir el crecimiento del explante.

Una de las mayores limitantes en el desarrollo de las plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las enfermedades endógenas, por lo que es importante realizar un método efectivo para eliminar bacterias y hongos presentes (Villamizar 2005; Hernández y González 2010).

Por ello, Roca (1991) y Pérez y Ramos (2012) coinciden que la desinfección de los explantes se debe hacer con etanol (70%) y el NaClO del 1.0% al 5.25% y



agregando agentes tensoactivo como el Tween-20, por un tiempo entre 10 y 20 min, removiendo los restos de los productos mediante varios lavados con agua destilada estéril, haciendo un mínimo de 3 enjuagues sucesivos. Mei-Chun (2005) utilizó estas mismas soluciones, pero con diferentes concentraciones, al utilizar 0.8% (v/v) de NaClO con 0.1% de Tween-20 por 8 min, obteniendo resultados favorables.

Thomas y Prakash (2004) adicionaron a la solución con 4% de NaClO, un antibiótico con gentamicina en proporción de 1 mL por 50 mg L<sup>-1</sup>, para el control de bacterias superficiales, indicando un 75% de explantes libres de contaminación en un monitoreo por 2 años.

Por su parte Roca (1991) comenta que entre los desinfectantes para explantes más empleados son el etanol (70% v/v) y el hipoclorito de sodio del 1% al 5.25% y en algunos casos agregar agentes tensoactivo como Tween-20, removiendo los restos de los productos mediante varios lavados con agua destilada estéril, haciendo un mínimo de 3 enjuagues sucesivos.

Castro (2005) desinfectó los esquejes en recipientes estériles, en constante agitación, con 50% de etanol por 30 s, seguido por hipoclorito de sodio al 0.5% durante 3 min y cuatro lavados con agua destilada, desionizada estéril, en la cámara de flujo laminar.

Vargas y Abdelnour (2010) mencionan la utilización de antibióticos como estreptomicina puede facilitar el establecimiento de cultivos estériles. Por otra parte, la aplicación de fungicidas y bactericidas en el material vegetal de partida puede ayudar a tener explantes más limpios (Debergh y Zimmerman , 1991).

### **2.9.2. Establecimiento Aséptico**

Para que el establecimiento sea exitoso, es necesario prevenir y controlar la contaminación microbiana y la oxidación fenólica, siendo uno de los problemas más graves que se debe enfrentar durante la micropropagación de frutales (Azofeifa, 2009; Hernández y González 2010).

Ibáñez (2004) menciona que en principio existen 4 fuentes de infección: la planta madre (en la superficie exterior e interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operador. Siendo la más importante la planta misma, de forma que el material vegetal deberá ser desinfectado antes de su aislamiento y puesto *in vitro* (Pierik, 1990).

Roca (1991) recomienda adoptar algunas precauciones en el establecimiento y manipulación de los cultivos como:

- Antes de comenzar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo, antes de introducirlos en la cámara.
- Es necesario que las manos y eventualmente, los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%.
- Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol al 95%.

- Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero.

Los frascos, tubos de ensayo y matraces necesitan ser cerrados para impedir su deshidratación e infección, por otro lado, tiene que ser posible el intercambio gaseoso con el exterior, para evitar una falta de oxígeno o el exceso de gases producidos como el CO<sub>2</sub> y el etileno (Pierik, 1990).

Algunos autores indican la utilización de antibióticos como esteptomicina (Vargas y Abdelnour, 2010)

### **2.9.3. Inducción de Brotes**

Tiene como objetivo la multiplicación de los brotes obtenidos a partir del meristemo. Por lo general, el medio de cultivo es similar al de la fase de establecimiento y es común utilizar citoquinina con el propósito de estimular la división celular e inhibir la dominancia apical para lograr el crecimiento del brote (Razdan, 2003).

Aunque esta técnica ha sido utilizada extensivamente para la multiplicación de numerosas especies. Es un método eficiente para la propagación masiva, rápida y de regeneración a través de la organogénesis de cualquier genotipo valioso obtenido por métodos no convencionales (Alizadeh *et al.*, 2010).

Obtenidos los meristemas se siembra en un medio de cultivo, en el cual se busca el crecimiento y regeneración medianete el aporte de nutrientes. La composición general de los medio de cultivo no varia mucho, este va a depender de los requerimientos de cada especie (Razdan, 2003). Los elementos esenciales son

macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre), micronutrientes (boro, cobalto, manganeso, hierro, zinc, molibdeno y cobre), compuestos orgánicos (vitaminas con tiamina, piridoxina y ácido nicotínico), fuente de carbono (generalmente sacarosa), reguladores de crecimiento y material de soporte.

Algunos autores indican la utilización de antibióticos como esteptomicina (Vargas y Abdelnour, 2010) con lo cual se facilita el establecimiento de cultivos estériles. Para lograr un buen crecimiento de las plantas *in vitro*, es necesario suplir el medio con una o más vitaminas. La más utilizada es la B1 (Tiamina) y se le considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* tales como: B2 (Riboflavina), B3 (ácido nicotínico), B5 (ácido pantoténico), B6 (Piridoxina), B9 (ácido ascórbico), con un rango de concentración de 1-100 mg L<sup>-1</sup>.

Hartmann y Kester (1997) comentan que el número de subcultivos y la composición del medio de cultivo pueden afectar la estabilidad genética y la tasa de multiplicación de las plantas obtenidas.

#### **2.9.4. Medios de Cultivo para la inducción de brotes**

Medios utilizados con frecuencia en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas son los de sales basales Murashige y Skoog (MS) (1962) con agar y el medio orgánico mínimo MS con agar y sacarosa. Para el cultivo de células y protoplastos y en la regeneración de plantas, es muy utilizado el medio Gamborg *et al.* (B5) (1968) marca la diferencia con el medio MS, aunque el B5 posee una mayor concentración de sales en general, por lo que se conoce como el medio de sales mayores (López *et*

*al.*, 2005). Por su parte, Nookaraju *et al.* (2008), evaluaron 6 diferentes medios basales para el establecimiento de segmentos nodales *in vitro*: MS (Murashige y Skoog, 1962), ER (Eriksson, 1965), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), NN (Nitch y Nitch, 1969), WPM (Llyod y McCrown, (1981) y C<sub>2</sub>d (Chee y Pool, 1987), con el fin de determinar el medio óptimo basal para el cultivar Crimson Seedless.

Investigaciones realizadas con cultivares de vid para consumo de mesa o para la elaboración de vinos han permitido definir medios y condiciones de cultivo estándares para la propagación *in vitro* (Guta *et al.*, 2008; Melyan *et al.*, 2015).

El número de subcultivos y la composición del medio de cultivo pueden afectar la estabilidad genética y la tasa de multiplicación de las plantas obtenidas (Hartmann y Kester, 1997).

Mei-Chun (2005) utilizó tres medios para determinar el grado de inducción de brotes y desarrollo, estos medios fueron el NN, MS y el WPM, todos suplementados con 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA, 2 % de sacarosa, 40 mg L<sup>-1</sup> de adenin fosfato, 170 mg L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol todo en 0.8% de agar. En este trabajo obtuvo resultados importantes al comparar y observar los mejores efectos en el medio WPM por encima de MS y NN, en donde se produjeron porcentaje de 1.3 a 1.9 brotes, con 7.5 a 11.2 nudos y de 8 a 12 hojas después de 1 mes de cultivado.

Gribaudo *et al.* (2001), Colocaron brotes individuales en el medio modificado de Murashige and Skoog, con sales minerales y vitaminas, adicionado con 20 gL<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 mg L<sup>-1</sup> de PBZ (Paclobutrazol) un triazol retardante de crecimiento, con

el fin de obtener brotes con mayor número de estomas, teniendo mayor densidad de estos en comparación a los que no estuvieron tratados con PBZ.

### **2.9.5. Multiplicación de brotes**

Algunas técnicas utilizadas para esta etapa sugieren la variación en la dosis de hormonas, reguladores de crecimiento y los medios como se mencionan a continuación.

La inclusión de citoquininas en el medio se generaliza aceptada como necesaria para la proliferación de brotes a partir de puntas apicales y brotes axilares (Mhatre *et al.*, 2000). El uso de BAP (6-bencilaminopurina) como citoquininas es utilizado en la estimulación tanto de la división celular y para promover el crecimiento de brotes axilares en cultivo de tejidos vegetales (George *et al.*, 2008). Por su parte (Mesa, 2001) reporta que, para la proliferación *in vitro*, esta se realiza con base en un medio de sales de MS con la sal  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , reducida a la mitad y el resto de las sales reducidas a tres cuartos, adicionando tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $1.1 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $170 \text{ mg L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), Sulfato de adenina ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ), Sacarosa al 3%, y ajustado a pH 5,7.

Singh *et al.* (2004), indican que para el inicio del cultivo de las variedades *Pusa Urvashi* y *Pusa Navrang* el uso de segmentos nodales cultivados en medios MS suplementados con  $2 \text{ mg/l}$  de BAP y  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (Ácido naftalenacético) presentan los mejores resultados.

Para la elongación, los mejores resultados se dieron en medio MS suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA utilizando como explante inicial segmentos de nudo de la variedad Albariño (Consuelo *et al.*, 2006).

Laslo *et al.* (2010), consigue el mayor porcentaje de regeneración utilizando segmentos nodales cultivados en medio MS suplementado con 5 mg L<sup>-1</sup> de BA y 825 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> en variedades de vid Cabernet Sauvignon y Riesling italiano.

Por su parte Ozden y Karaaslan (2011), utilizaron la combinación de 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BA con NAA para la reducción de nivel de radicales libres y la producción fenólica asociadas con la capacidad de proliferación de las células de vid sometidas a cultivo *in vitro*.

#### **2.9.6. Enraizamiento**

Los brotes obtenidos son sometidos a condiciones de enraizamiento y preparación para ser trasplantados *ex vitro*. Para este procedimiento se deben transferir por unos días a un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y posteriormente se subcultivan en medio para la inducción de raíces *in vitro*. Razdan (2003), recomienda que se disminuyan los niveles de citoquinina exógenas y se aumenten los de auxina exógena. Adicionalmente, se debe disminuir la concentración de las sales y de la fuente de carbono. El tiempo de duración de esta etapa depende de la especie o variedad y el tipo y concentración de reguladores de crecimiento (Debergh y Zimmerman 1991). Por su parte, Roa y Torres (2012) comentan que el enraizamiento satisfactorio de una microestaca es fundamental para la sobrevivencia de las plántulas generadas *in vitro*. La generación de un sistema radical puede inducirse

antes o después de extraer la microestaca del recipiente de vidrio. Es más eficiente enraizar en terreno por costo y beneficio que en el mismo medio, ya que, las ventajas que trae en el ambiente externo es que regulan sus mecanismos fisiológicos al mismo tiempo de la inducción de raíces, lo que representa una economía en tiempo y costo (Barba *et al.*, 2001).

Jaskani *et al.* (2008), para la formación de raíces, de microestacas en un medio MS suplementado con 0, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, obtuvieron únicamente resultados de raíces en la dosis de 1.0 mg L<sup>-1</sup> con un 80%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hicks y Dorey (1988), quienes también trabajaron con el medio MS adicionado con AIB dándoles buena respuesta. Mientras que, Mesa (2001), utilizó para la fase de enraizamiento, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 25 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA, sacarosa al 1%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mgL<sup>-1</sup> y 1.5 g L<sup>-1</sup> de gelrite más 0.5 g L<sup>-1</sup> de agar Merck. Obteniendo los mejores resultados en microestacas apicales con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Así mismo, Nookaraju *et al.* (2008) utilizaron diferentes auxinas para observar la aparición de raíces, en un medio MS a la mitad de sus sales, adicionado con AIA (0.57-1.71 mg L<sup>-1</sup>), AIB (0.49-1.48 mg L<sup>-1</sup>) o ANA (0.54-1.61 mg L<sup>-1</sup>), donde al evaluar el uso de ANA obtuvo la mayor cantidad de raíces comparada con AIB en las mismas concentraciones. Por su parte, las altas concentraciones de las auxinas indujeron la formación de callo, considerando la mejor auxina la ANA a 1.07 µM con el 100% en inducción de raíces (Nookaraju *et al.*, 2008).

#### **2.9.7. Aclimatación**

Es la etapa conocida como endurecimiento, proceso mediante el cual las plantas obtenidas en condiciones *in vitro* se transfieren gradualmente a un ambiente *ex vitro*.



Para obtener éxito en los resultados se debe reducir gradualmente la humedad relativa que rodea a la planta, con el objetivo de lograr que la planta controle la transpiración y pueda adaptarse a un sustrato en condiciones de campo (Hartmann y Kester, 1997). Mientras que, Thomas (1998), comenta que la aclimatación de las plantas *in vitro* es a menudo difícil porque ellas poseen tallos y hojas suculentas, debido a la alta humedad dentro del vaso de cultivo, y el agua libre en el medio.

Osuna y Saucedo (2010) usaron microestacas de 3 cm de largo, con tres a cuatro hojas verdaderas. Los tubos que se pre-aclimataron, los taparon con papel filtro y sobre éste se colocó papel aluminio, al cual se le hizo un orificio de 3 mm, aproximadamente, y luego los sellaron con *parafilm*. Los tubos que no se pre-aclimataron, se taparon solamente con papel aluminio y se sellaron con *parafilm*. Se demostró en plantas de vid enraizadas *in vitro*, que pre-aclimatando se logran tasas de sobrevivencia más altas. Sin embargo, la sobrevivencia de plantas aclimatadas, no influye el tipo de enraizamiento, la pre-aclimatación ni el sustrato. Por su parte, Manzur (2005) aclimató explantes con al menos dos raíces primarias con un tamaño superior a 3 cm, eliminando el agar con chorro de agua corriente, ya limpias se sumergieron en una solución de Ridomil ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) o Captan ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ). Utilizó una cámara con condiciones ambientales (90% HR,  $24^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo de 12 horas luz, permaneciendo hasta que se presentó una hoja nueva desplegada (alrededor de tres semanas), trasplantando a sustrato (tierra) y llevadas a invernadero con un 90% de sobrevivencia.

## **2.10. Problemáticas de la Micropropagación**

### **2.10.1. Contaminación**

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo (Debergh y Zimmerman.1991). Así mismo, Fuentes y Chuquillanque (2003), aseguran que las contaminaciones bacterianas o fúngicas se pueden detectar mediante simples observaciones visuales (microscopio estereoscópico). Existen bacterias endógenas que permanecen latentes en la planta y aparecen en subcultivos avanzados. Para las contaminaciones virales, el diagnóstico se realizará en las plantas madres, antes de introducirlas en el cultivo *in vitro*.

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar desinfecciones superficiales y fungicidas además de antibióticos (Casells, 1991).

La contaminación de los Explantes se puede presentar en forma exógena por deficiente esterilización del material vegetal o en forma endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos difícil de controlar. En el curso del crecimiento de las plantas, hay muchos microorganismos de la superficie o de la rizósfera que pueden colonizar la planta a través de aberturas naturales, heridas etc., adicionalmente hay

patógenos facultativos y obligadas que pueden colonizar o penetrar vía vectores o mediante plantas hospederas (Seemann, 1993).

### **2.10.2. Oxidación**

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro*. La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. Las células vecinas de las inicialmente lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura (Debergh y Zimmerman, 1991).

Margara (1988), comenta que la luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de especies en cultivo *in vitro*. Por otra parte, Seemann (1993), dice que los explantes como el medio de cultivo de algunas especies, sobre todo leñosas, una vez puestas en cultivo *in vitro*, tienen la tendencia a manifestar un pardeamiento que lleva a la muerte de los explantes. Este pardeamiento se produce por acción de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas, que se liberan al herirse los tejidos. Los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar eventos morfogénéticos y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando otros procesos de oxidación, puesto que se convierten en potentes oxidantes (Dixon y Paiva, 1995). Debergh y Read (1991), mencionan que una forma mediante la cual se puede evitar la oxidación es evitando el estrés que estimula la

biosíntesis de compuestos fenólicos, con el fin de impedir que estas sustancias aparezcan en los cultivos y produzcan efectos tóxicos e inhiban el crecimiento.

Thomas y Ravindra (1997), utilizaron la síntesis de fenoles para evitar la dispersión, adsorción o lavado, con sustancias como el carbón activado (CA) o la polivinilpirrolidona (PVP), la modificación del potencial redox, o la disponibilidad de oxígeno, la inactivación de enzimas de tipo fenolasa (quelantes), y otros sistemas como la incubación en condiciones de oscuridad, bajo pH, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar éstas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima. Así mismo, Debergh y Read (1991), también comentan la adición de sustancias antioxidantes, pero resaltan el cuidado que se debe de tenerse ya que puede convertirse en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles.

Pierik (1990) menciona que para controlar la oxidación o pardeamiento existen diversos métodos:

- Adicionar carbón activado al medio.
- Adicionar PVP al medio, con el fin de absorber las sustancias de tipo fenólicas.
- Adicionar al medio antioxidantes como ácido cítrico, ascórbico, tiourea o L-cistina
- Adición de aminoácidos como glutamina, arginina y asparagina.
- Cambio frecuente a medio fresco, frena lentamente la formación de pigmentos.
- Mantener las bases de los vástagos en la oscuridad durante el cultivo, puede disminuir la oxidación causada por foto-activación.
- La reducción de sales en el medio de cultivo puede reducir la exudación.

- La eliminación de reguladores de crecimiento puede disminuir la oxidación.

### **2.10.3. Fenolización**

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro*. Esta situación estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va produciendo una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura. En general los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación tiene carácter fitotóxico y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, puesto que se convierte en potentes oxidaciones (Afanador, 2005).

Una de las mayores limitantes en el desarrollo de las plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las enfermedades endógenas y la excreción de sustancias como los polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación. El establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas, se verá impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos. El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por la acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y en

consecuencia inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Hernández y González, 2010).

Según Rivero *et al.* (2001), hicieron la observación de que existe una relación entre la oxidación y la posición que ocupa el nudo en la rama, ya que en cultivos como la uva (*Vitis vinifera* L.), se han detectado un efecto significativo de la posición de los ápices, determinando menor contenido de compuestos fenólicos en los laterales que en los terminales, con la consecuencia reducción de la oxidación.

La adición de sustancias antioxidantes, es otro de los métodos que suelen aplicarse, aunque es necesario tener mucho cuidado, ya que se pueden convertir en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles (Afanador, 2005).

#### **2.10.4. Dosis de hormonas y reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1Mm. Cada uno de los reguladores no solo influyen en la respuesta dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y diversos ambientes, por lo que es riesgoso generalizar acerca de los efectos de un tejido u órgano vegetal en particular (Cuadro 3) (Salisbury y Ross, 1994).

Las sustancias reguladoras de crecimiento vegetal son las auxinas, las citoquinina y las giberalininas como inductoras de crecimiento y el ácido abscísico y el etileno, como inhibidoras del crecimiento (Rodríguez y Carvajal, 2009).

El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más conocida, es una hormona natural que se produce en los ápices de los tallos, meristemos y hojas jóvenes de yemas terminales, de allí migra por el floema al resto de la planta en forma basipétala (de arriba hacia abajo), durante su circulación, la auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical (Suárez, 2011). Las hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias químicas orgánicas que se sintetizan naturalmente, y se activan en pequeñas concentraciones. Son moléculas específicas involucradas en la inducción y regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas sustancias son sintetizadas en un lugar específico y traslocadas al lugar de acción (Hartmann *et al.*, 2002).

**Cuadro 3.** Efecto de los principales reguladores de crecimiento.

Fitoregulador	Efecto en la planta
Auxinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induce la división celular.</li> <li>- Induce elongación de la pared celular.</li> </ul>
Giberalininas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe la formación de tallos y raíces..</li> <li>- Participa en el desarrollo de órganos preformados.</li> </ul>
Citoquinina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estimula la división celular.</li> <li>- Rompe el estado de dormancia en yemas laterales.</li> </ul>

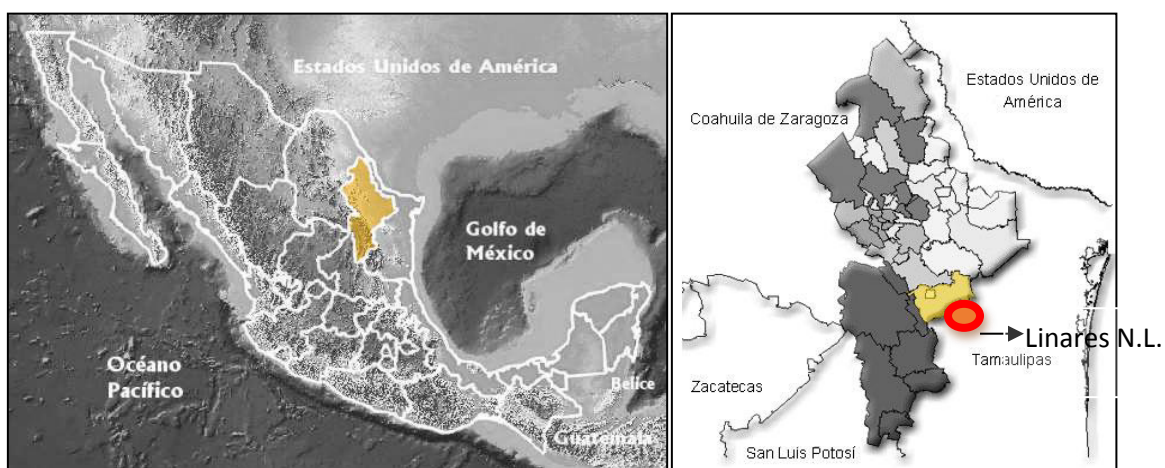
Ácido abscísico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ayuda a la maduración y crecimiento de embriones somáticos.</li> <li>- Ayuda a la tolerancia de bajas temperaturas.</li> </ul>
Etileno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promotor de la maduración de frutos.</li> <li>- Promotor de senescencia y abscisión de hojas.</li> <li>- Efectos negativos en la elongación de tallos y raíces.</li> <li>- Efectos negativos en la formación de yemas axilares y adventicias.</li> <li>- Afecta la embriogenesis y en enraizamiento.</li> </ul>



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización de área de estudio

El material vegetal que se utilizó en el presente trabajo fue colectado en la huerta del Centro de Investigación en Producción Agropecuaria (CIPA) de la UANL, ubicado en la Carretera Nacional Linares- Cd. Victoria km 145, A.P.93, C.P. 67700 Linares, N.L., México (coordenadas 24°79'53.3" N, 99°53'13.8S) (Figura 1).



**Figura 1.** Lugar de recolección del material vegetal en el Municipio de Linares, Nuevo León



**Figura 2.** Centro de Investigación en Producción Agropecuaria, Linares, N. L.

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía, Unidad Marín, ubicado en carretera Zuazua-Marín km 17.5, C.P. 66700 Marín, N. L., de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



**Figura 3.** Laboratorio de Biotecnología Vegetal unidad Marín, en Marín N.L.

### **3.2. Selección de plantas en Campo**

Fueron utilizadas plantas de tres años de edad, las cuales se visualizaban como sanas y representativas del genotipo, se cortaron varetas de 15 a 25 cm de longitud de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot, teniendo identificada la planta para darle seguimiento a su desarrollo durante las recolectas (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Identificación de plantas seleccionadas según su ubicación en campo.

Variedad	Merlot	Cabernet Sauvignon
1	2B3	11I1
2	3G3	12Q1
3	4C1	13C2
4	4C3	15C1
5	4O3	16G1
6	5H3	16J3
7	7K2	16O2
8	7Q2	17B1

### **3.3. Trabajo previo a la recolección del material vegetal**

Antes de la recolección se le aplicó una solución que contenía 2 g L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina y 2 g L<sup>-1</sup> de benomilo, durante las dos semanas previas con una frecuencia de 2 veces por semana, esto con el fin de disminuir la cantidad de patógenos.

### **3.4. Proceso de recolección del material vegetal**

Después de marcar las plantas, se tomaron las muestras y se colocaron en bolsas de plástico, se cortaron solo los brotes que cumplían con al menos 5 entrenudos, se desinfectaron las tijeras de corte con alcohol etílico absoluto (Figura 4).

Se colocaron las muestras en una hielera y se trasladaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Unidad Marín de la Facultad de Agronomía de la UANL.



**Figura 4.** Proceso de selección de plantas en campo de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot.

### 3.5. Técnica de pre-desinfección de los explantes

La pre-desinfección consistió en seleccionar material colectado de árboles sanos previamente recolectados de campo abierto, se lavaron las varetas de 15 a 25 cm de longitud con jabón líquido y agua potable, con la ayuda de un cepillo de cerdas finas. Posteriormente se seccionaron las yemas de las varetas de 2 a 3 cm y se colocaron en gasas para pasar posteriormente por una solución de  $1.5 \text{ mL}^{-1}$  de bactericida vegetal más  $2.0 \text{ mL}^{-1}$  de blanqueador comercial (Cloralex<sup>®</sup>) durante 10 min, seguido de tres enjuagues con agua bidestilada. La pre-desinfección se colocó en una solución bactericida-fungicida con  $1.5 \text{ mL L}^{-1}$  de Amistar<sup>®</sup> Gold (azoxistrobin 18%) y  $2 \text{ gr L}^{-1}$  de Benomilo durante 60 min (Figura 5).

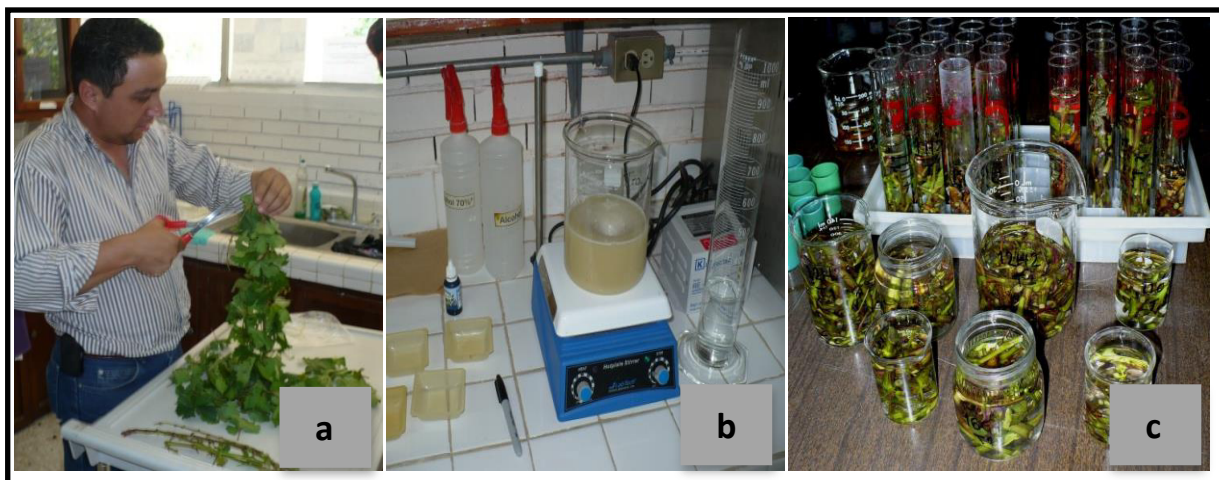


Figura 5. Procesamiento del materiales vegetales y pre-desinfección de explantes. a) Corte de explantes, b) pre-desinfección en solución bactericida-fungicida, c) enjuagues con agua biodestilada.

### 3.6. Técnica de desinfección

El proceso de desinfección se realizó en la campana de flujo laminar. El tratamiento de desinfección comenzó al sumergir el material vegetal en una solución con blanqueador comercial (Cloralex ®) al 30% v/v adicionado de 0.2% de Tween-20 durante 10 y 15 min. Concluido el tiempo se enjuagó tres veces con agua bidestilada estéril, por último, se colocaron los explantes en una solución antioxidante con 400 mg L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) durante el proceso de siembra (Figura 6).



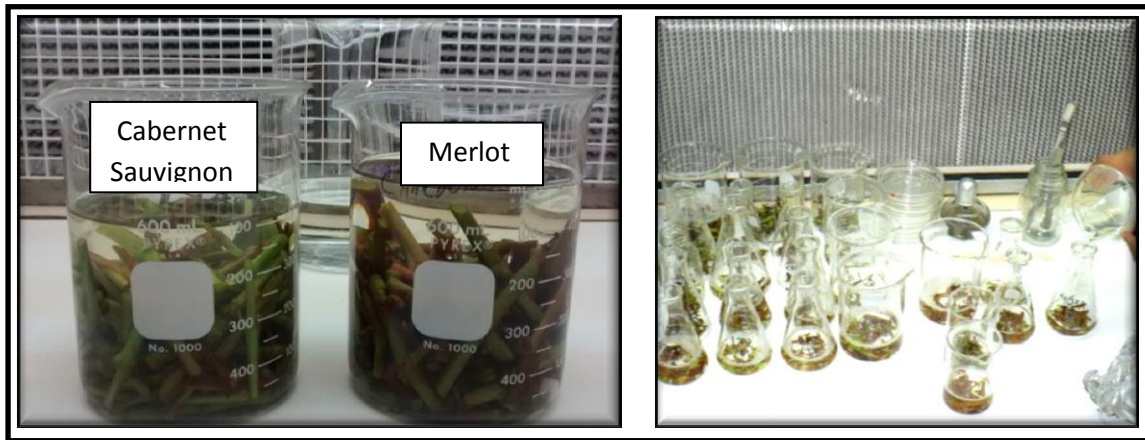


Figura 6. Desinfección de los explantes de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot, bajo campana de flujo laminar.

### 3.7. Establecimiento aséptico *in vitro* de los explantes

Los explantes se dividieron para ser establecidos como meristemos y microestacas, según la condición del explante.

Las microestacas se sembraron en dos medios de cultivo, el primero en un MS (Cuadro 5) sin la adición de reguladores de crecimiento, vitaminas ni antioxidantes. El segundo en un medio MS adicionado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de glutamina,  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico, vitaminas y  $30 \text{ gr L}^{-1}$  de sacarosa, ambos ajustados a un pH de  $5.7 \pm 0.02$ , previamente esterilizados a  $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión a  $121^\circ \text{C}$  durante 15 min.

**Cuadro 5.** Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962).

Componentes	Cantidad (mg L <sup>-1</sup> )
<b>MACROELEMENTOS</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.000
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	400.000
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	556.000
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990.000
<b>MICROELEMENTOS</b>	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.300
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.800
Na <sub>2</sub> EDTA· 2H <sub>2</sub> O	37.300
<b>ORGÁNICOS</b>	
Mio-inositol	100
Acido Nicotínico	0.500
HCl-Piridoxina	0.500
Glicina	2.000
HCl-Tiamina	0.400
Sacarosa	30000

Mientras que los meristemos se sembraron también en dos medios de cultivo, el medio MS sin la adición de reguladores de crecimiento, vitaminas ni antioxidantes, y

el segundo en un medio MS suplementado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina,  $170 \text{ mg L}^{-1}$  de fosfato de sodio,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mioinositol, vitaminas y  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, ambos ajustados a un pH de 5.7 y  $4.3 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel <sup>TM</sup>, previamente esterilizados a las mismas condiciones que los medios anteriores (Figura 7).

Concluida la siembra, los frascos fueron incubados en condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura, 16 h luz y 8 de oscuridad y temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 semanas.

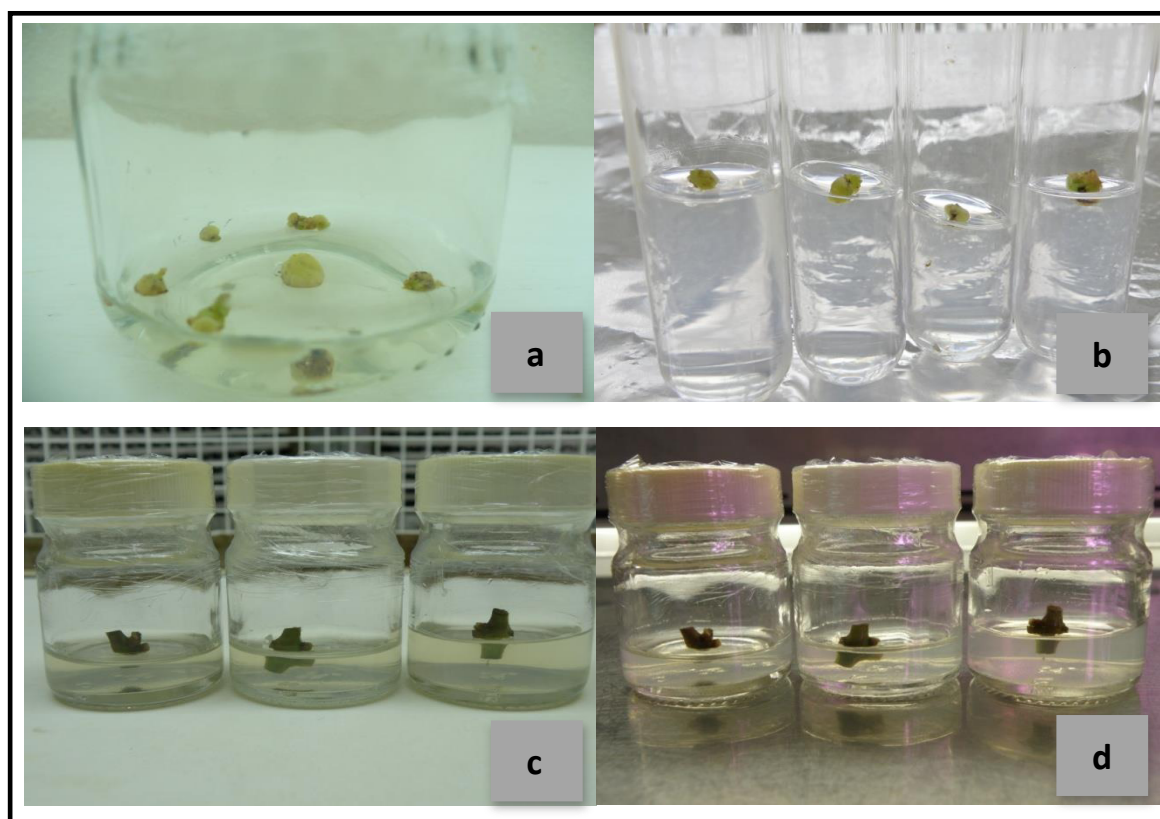


Figura 7. Establecimiento aséptico en el medio MS con explantes de meristemos (a. Merlot y b. Cabernet Sauvignon) y yemas axilares (c. Merlot y d. Cabernet)



### **3.8. Inducción de brotes establecidos *in vitro***

Para la etapa de inducción de brotes se utilizaron explantes viables provenientes de microestacas y meristemos los cuales se sembraron en un medio MS con tres concentraciones de BAP, mientras que , las microestacas se subcultivaron al medio básico MS adicionado con tres concentraciones diferentes de reguladores: Medio 1 (M1) suplementado con 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP, Medio 2 (M2) suplementado con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP y Medio 3 (M3) suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, todos los medios suplementados con vitaminas, 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol, 30 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, y 60 mg L<sup>-1</sup> ácido cítrico. Los medios de cultivo se ajustaron a pH de 5.7 y se esterilizaron a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C durante 15 min. Siendo incubado en condiciones controladas de temperatura de 26 ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de obscuridad en estas condiciones permanecieron por 8 semanas.

Así mismo los meristemos fueron subcultivados al medio básico MS adicionado con tres concentraciones diferentes de reguladores: Medio 1 (M1) suplementado con 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP, Medio 2 (M2) suplementado con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y Medio 3 (M3) suplementado 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, todos los medios suplementados con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 1.0 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de glicina. Los medios de cultivo se ajustaron a pH de 5.7 y se esterilizaron a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C durante 15 min. Siendo incubado en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo igual que las microestacas por 8 semanas.

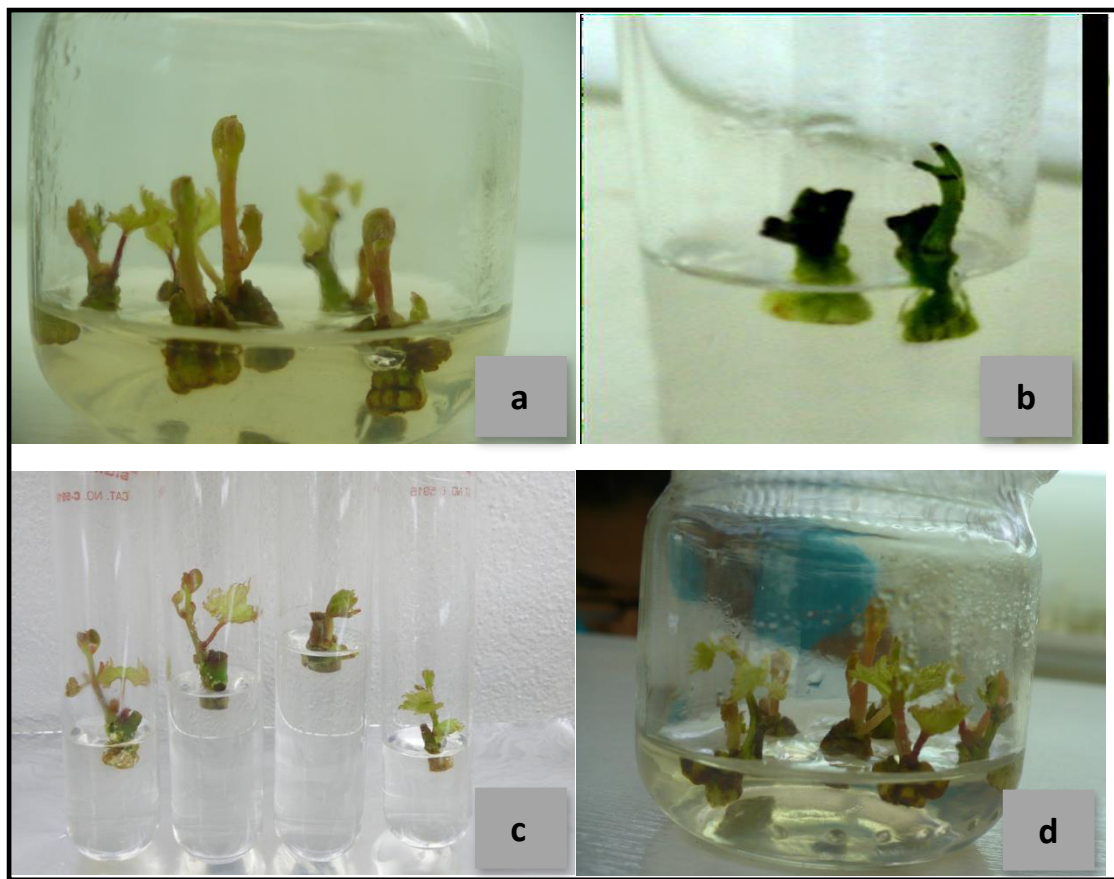


Figura 8. Inducción de brotes en el medio MS de ambos explantes del cultivar CS y Merlot (a. meristemo de Merlot y b. cultivar CS) y yemas axilares (c Merlot y d CS).

### 3.9. Etapa de Multiplicación de brotes

Se establecieron brotes en los medios de multiplicación, los cuales fueron el medio MS al 100 y 50% de sus sales básicas suplementados con 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, además del medio WPM (Cuadro 6), suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, adicionado con vitaminas, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 1.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado (CA), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 4.3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup> (Cuadro 7), ajustado a un pH de 5.7. Esterilizado con anterioridad a temperatura y presión igual que el medio anterior, donde posteriormente los explantes se establecieron en estos medios, al concluir la transferencia de los materiales las unidades experimentales se pasaron al cuarto de

incubación, permaneciendo bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas-luz y ocho de oscuridad a  $100 \mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$  y  $24 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura, durante 8 semanas.

**Cuadro 6.** Componentes del medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (1981).

Componentes	Cantidad (mg L <sup>-1</sup> )
<b>MACROELEMENTOS</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	96
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	556
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990
<b>MICROELEMENTOS</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
<b>ORGÁNICOS</b>	
Mio-inositol	100
HCl-Tiamina	1
Acido Nicotínico	0.5
HCl-Piridoxina	0.5
Sacarosa	30000

**Cuadro 7.** Medios de cultivo en la multiplicación de brotes.

Medio	BAP mg L <sup>-1</sup>	
	0.5	1.0
MS 50%	M1	M2
WPM	M3	----
MS 100%	M4	M5

### **3.10. Diseño experimental**

Para la etapa de establecimiento aséptico se evaluaron las variables contaminación y viabilidad de los explantes a las 4 semanas después del establecimiento *in vitro*, los resultados se evaluaron a través de estadística no paramétrica mediante Tablas de contingencia utilizando pruebas de Ji-Cuadrada ( $X^2$ ), con la finalidad de probar la diferencia de los efectos de los factores principales de la interacción de dos factores o cualquier otra distribución teórica de probabilidad (Arvelo, 1998), los cuales fueron analizados con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistical 17.0).

Para la etapa de inducción de brotes el diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con un arreglo factorial de 2 x 2 x 3, donde el factor A fueron los cultivares, el B los tipos de explantes y el C la dosis de BAP, con 8 repeticiones. Se utilizó una prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS), para comparar las medias de los diferentes tratamientos, con un 5% de probabilidad. Las variables a

evaluar fueron el número de brotes y longitud de brotes, los cuales fueron analizados a las 8 semanas, con el paquete estadístico SPSS Statistical 17.0.

Para la etapa de multiplicación de brotes, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2 \times 5$ , donde el factor A fueron los cultivares y el B son los medios de multiplicación con 8 repeticiones. Se utilizó una prueba de DMS, para comparar las medias de los diferentes tratamientos, con una prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Las variables a evaluar fueron el número y longitud de brotes, a las 8 semanas, los cuales fueron analizados con el mismo paquete estadístico de las anteriores etapas.

Para la etapa de enraizamiento, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de  $2 \times 5$ , donde el factor A fueron los cultivares y el B son los mismos medios de la etapa de multiplicación, con 8 repeticiones. Se utilizó una prueba de DMS, para comparar las medias de los diferentes tratamientos, con una prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Las variables a evaluar fueron el número y longitud de raíces, a las 8 semanas, las cuales fueron analizadas con el mismo paquete estadístico que las anteriores. Cabe señalar que para esta etapa no fue necesario utilizar medios específicos ya que se indujo el enraizamiento en la etapa de multiplicación.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Establecimiento Aséptico

La desinfección de explantes es esencial para el cultivo *in vitro* de células y tejidos como para la conservación de germoplasma *in vitro*, tal es el caso de la vid para vinificar (Lazo-Javalera *et al.*, 2016).

#### 4.1.1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio

La concentración de hipoclorito de sodio evaluada resultó satisfactoria contra microorganismos en los explantes utilizados, ya que la técnica de desinfección utilizada permitió obtener una baja contaminación en la mayoría de los explantes de los dos cultivares, después de 4 semanas del establecimiento. Con respecto al cultivar Cabernet Sauvignon, se presentó un 20% de contaminación en ambos tratamientos con meristemas, en comparación con Merlot donde los porcentajes de contaminación fueron de 32% en el tratamiento uno y en el dos fue de 24% (Cuadro 6A). Por otro lado, cuando se utilizaron las microestacas como explantes en Cabernet Sauvignon, se presentó un 20% en el tratamiento uno y en Merlot fue de 28% en el tratamiento dos (Cuadro 8). Estos resultados aquí mostrados son similares a lo reportado por Rodrigo *et al.*, (2006) quienes obtuvieron contaminaciones entre el 5 y 45% al utilizar concentraciones similares del agente desinfectante a las de esta investigación.

**Cuadro 8.** Contaminación de explantes de vid (*Vitis vinifera* L.) en tratamientos de desinfección, después de cuatro semanas del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Cultivar	Explante	Contaminación <sup>1</sup> (%)
T1	Cabernet Sauvignon	Meristemo	20
T2	Cabernet Sauvignon	Meristemo	20
T1	Merlot	Meristemo	32
T2	Merlot	Meristemo	24
T1	Cabernet Sauvignon	Yemas Axilares	32
T2	Cabernet Sauvignon	Yemas Axilares	20
T1	Merlot	Yemas Axilares	40
T2	Merlot	Yemas Axilares	28

<sup>1</sup>Promedio de 5 repeticiones

Mientras que Jaskani *et al.* (2008), no obtuvieron diferencia significativa al aumentar el tiempo de exposición de los explantes al Clorox 10% por 5, 10 y 15 min.

Con respecto al uso de fungicidas Pasqual y Ferreira (2007), reportaron el empleo de fungicidas de amplio espectro previo al cultivo *in vitro*, mostrando resultados efectivos, sobre todo en explantes de meristemos, para el control de un amplio rango de microorganismos, sin generar efectos de daño en el material vegetal.

A diferencia de Hernández *et al.* (2013), quienes reportaron que la principal fuente de contaminación fueron bacterias de diferentes tipos, esto es contrastante con lo encontrado en nuestra investigación en donde predominaron los hongos (Figura 9).

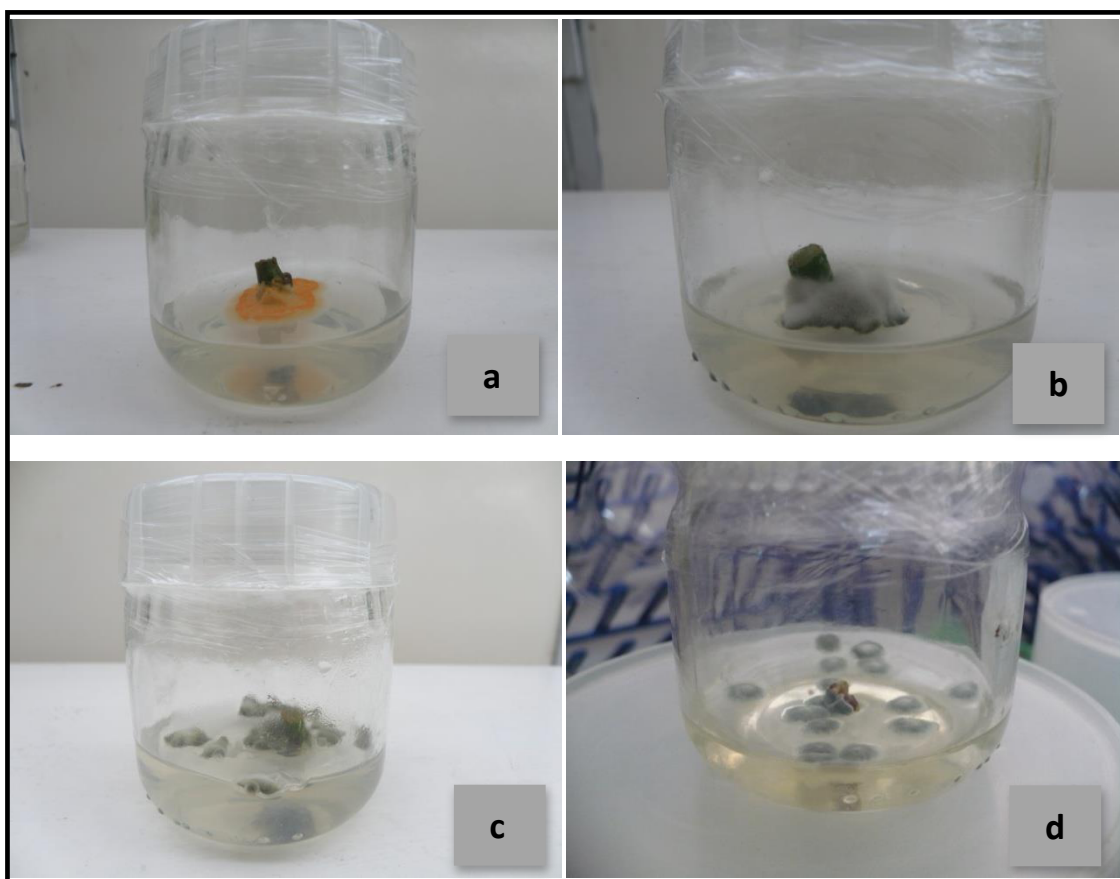


Figura 9. Contaminación de los explantes después de 4 semanas del establecimiento aséptico en ambos cultivares. Cabernet Sauvignon (a bacteria y b hongo) y Merlot (c y d hongo).

Los resultados con respecto a los tiempos de exposición, para las variables contaminación y viabilidad, se analizaron, con las tablas de contingencia con prueba de Ji-cuadrada (Cuadro 9), mostraron ser independientes a los cultivares, es decir, que no existe relación significativa entre las contaminación y la viabilidad con los cultivares ( $p \leq 0.05$ ).



**Cuadro 9.** Resultados de la prueba de ji Cuadrada para los cultivares de Cabernet Sauvignon y Merlot en los dos tipos de explantes de vid (*Vitis vinifera* L.)

Tratamiento	Cultivar	Explante	$\chi^2$	Sig. $p \leq 0.05$
T1	Cabernet Sauvignon	Meristemo	1.33	0.248
T2	Cabernet Sauvignon	Meristemo	1.19	0.275
T1	Merlot	Meristemo	1.33	0.248
T2	Merlot	Meristemo	1.19	0.28
T1	Cabernet Sauvignon	Yemas Axilares	0.05	0.82
T2	Cabernet Sauvignon	Yemas Axilares	0.05	0.81
T1	Merlot	Yemas Axilares	0.298	0.58
T2	Merlot	Yemas Axilares	0.5	0.47

Los problemas de contaminación disminuyeron al utilizar fungicidas de amplio espectro previo a la recolección del material vegetal, esta respuesta es similar a lo reportado por Pasqual y Ferreira (2007) que también utilizaron fungicidas de amplio espectro para controlar la contaminación. La contaminación en meristemos se presentó entre 10 a 16.66% mientras que en microestacas fue de 33.3 a 50%. Esta respuesta es equivalente a lo reportado por Rodrigo *et al.* (2006) quienes obtuvieron contaminaciones entre 5 y 45% en vid. A diferencia de Hernández *et al.* (2013), que mencionan que el principal contaminante fueron bacterias de diferentes tipos. En nuestro estudio el uso de oxitetraciclina en combinación con la gentamicina controlaron el problema de bacteria, siendo más recurrente la presencia de hongos.

Para evitar el proceso de oxidación, común de las plantas leñosas, se tomó en cuenta lo comentado por Jaskani *et al.* (2008), quienes indican que para evitar la oxidación es importante estar hacer subcultivos a medios frescos cada 2 a 3 semanas.

#### **4.1.2. Viabilidad de los explantes**

Con respecto a la viabilidad, los explantes del cultivar Cabernet Sauvignon tuvieron la más alta viabilidad en el tratamiento dos, tanto en meristemos como en yemas axilares con porcentajes entre 80 y 88 (Cuadro 10), semejante a lo obtenido por Abido *et al.* (2013), ellos obtuvieron el 80% al exponer sus explantes a una concentración de NaClO de 0.52% por 15 min.

Por otra parte, el cultivar Merlot, tuvo sus bajos porcentajes de viabilidad entre 72 y 76, similar a lo reportado por Melyan *et al.* (2015), utilizando un tratamiento de desinfección muy semejante al utilizado en nuestro experimento obtuvieron un 75% de sobrevivencia en sus brotes.

**Cuadro 10.** Efecto del NaClO a diferentes tiempos en la viabilidad en ambos explantes de vid (*Vitis vinifera* L.).

Tratamiento	Cultivar	Explante	% Viabilidad
T1	Cabernet Sauvignon	Meristemo	80
T2	Cabernet Sauvignon	Meristemo	80
T1	Merlot	Meristemo	68
T2	Merlot	Meristemo	76
T1	Cabernet Sauvignon	Yemas Axilares	68
T2	Cabernet Sauvignon	Yemas Axilares	80
T1	Merlot	Yemas Axilares	60
T2	Merlot	Yemas Axilares	72

Los resultados obtenidos pueden estar relacionados con lo mencionado por Marulanda *et al.* (2010), quienes mencionan que la principal tarea de limpieza en los explantes está limitada a la esterilización superficial de estos. Asimismo, Olmos *et al.* (2010), mencionan que en muchos de los casos se presenta la contaminación después de la desinfección debido a la presencia de patógenos endógenos, los cuales pueden ser controlados con la aplicación de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo.

## 4.2 Inducción de Brotes

Los explantes viables fueron transferidos a medio fresco para la etapa de inducción de brotes, donde las variables evaluadas fueron el número de brotes y la longitud de brotes (cm) evaluadas después de 8 semanas de establecidas.

### 4.2.1. Número de brotes

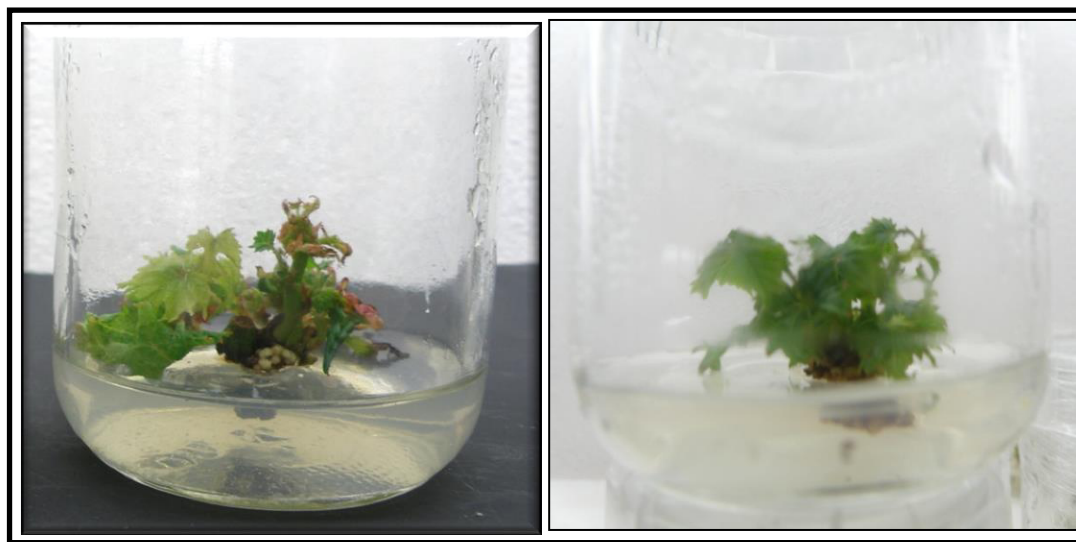
La inducción de brotes se evaluó después de 8 semanas de ser transferidos los explantes a los medios de cultivo, los resultados obtenidos tuvieron diferencia significativa, resultando una mayor respuesta en el medio MS suplementado con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, el cual demostró ser el medio más eficiente con un valor de 2.37 sig.  $p \leq 0.05$ , en comparación con el medio tres que fue únicamente de 1.5 (Cuadro 11), estos resultados son muy similares a lo reportado por Mukherjee *et al.* (2010), quienes obtuvieron 2.73 brotes en un medio MS a los 30 días del subcultivado. Mientras que Melyan *et al.* (2015) obtuvieron sus mejores resultados al utilizar en el medio Gamborg B5 adicionado con  $0.6 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN más  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, con un número de brotes por explante de  $4.5 \pm 0.1$  (Figura 10).

**Cuadro 11.** Comparación de medias en la inducción de brotes en el medio MS para meristemas en ambos cultivares suplementado con tres concentraciones de BAP a las 8 semanas de subcultivos.

Medio	Número De Brotes	Longitud de Brotes
M1 MS + 1.5 BAP	1.15ab	1.04b
M2 MS + 1.0 BAP	1.88 a	2.15a
M3 MS + 0.5 BAP	1.05b	1.23b

† Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa. Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

\* Longitud en cm.



**Figura 10.** Respuesta del cultivar Cabernet Sauvignon en el Medio MS adicionado con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP a las 8 semanas del subcultivo.

#### **4.2.2. Longitud de brotes**

Para la longitud de brotes los medios MS suplementados con BAP al 0.5 y 1.5, tuvieron valores promedios de 1.74 y 1.78 cm (Cuadro 12), estos resultados son similares a los obtenidos por Nookaraju *et al.* (2008), en el medio B5, con un promedio 2.45 cm de longitud.

Así mismo Rodrigo *et al.* (2006) al observar el crecimiento promedio de la variedad 110R, en un medio MS, después de 8 semana obtuvo un promedio de 1.9 cm de longitud.

La variabilidad que se muestra entre las variedades ante el mismo medio de cultivo, pone de manifiesto la importancia del genotipo en la respuesta a los reguladores de crecimiento, confirmando lo señalado por Mhatre *et al.* (2000) quienes señalan diferencia entre los cultivares Thompson Seedless, Sonaka y Tas-e-Ganesh, además en los trabajos de Pinto-Sintra (2007) y Barreto *et al.* (2008) encontraron diferencias importantes en el comportamiento no solo entre variedades de vid, sino también entre clones de una misma variedad.

**Cuadro 12.** Comparación de medias en la inducción de brotes en los medio MS para microestacas para ambos cultivares suplementado con tres concentraciones de BAP a las 8 semanas de subcultivados.

Medio	Número De Brotes	Longitud de Brotes
M1 MS + 1.5 BAP	1.75ab	1.74b
M2 MS + 1.0 BAP	2.38 <sup>a</sup>	2.45 <sup>a</sup>
M3 MS + 0.5 BAP	1.50b	1.78b

\*Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa. Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

\*Longitud en cm.

### 4.3 Multiplicación de brotes y enraizamiento

Con el objetivo de mantener y aumentar la cantidad de brotes, durante 8 semanas se estuvo evaluando la formación y elongación de nuevos brotes y desarrollo de raíces para poder evaluar los medios utilizados.

#### 4.3.1 Número y longitud de brotes

Los mejores resultados para la multiplicación de brotes fueron en los medios M2 y M1 con 6.37 y 5.06 (Cuadro 13) respectivamente, estos datos son muy similares a lo reportado por Chee *et al.* (1984) quienes trabajaron con los cultivares Cabernet Sauvignon y Chardonnay obteniendo multiplicaciones de 5 y 11 brotes al haber

transcurrido 67 días con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP así mismo, Aazami (2010) obtuvo sus mejores resultados en el medio MS adicionado con  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  AIB +  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, con medias de 3.8 y 5.4, en cultivares de “Soltanin” y “Sahebi” después de cuatro semanas.

Por su parte, Mei-Chun (2005) comparó los medios MS, NN y WPM, teniendo los mejores resultados con el WPM a concentración de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , obteniendo de 3 a 4 brotes por explante, estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra investigación en el mismo medio, con 4,37 brotes promedio en ambos cultivares (Figura 11).

Con respecto a la longitud de brotes Dessoky y Attia (2016), obtuvieron su mejor respuesta en el medio MS adicionado con  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP obteniendo un promedio de 3.6 cm en el cv. Al-Bayadi. Por su parte Nookaraju *et al.* (2008), utilizaron una alta concentración de BAP, al  $2.22 \text{ mg L}^{-1}$  más  $0.49 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, obtuvieron 2.99 cm en promedio, resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo con un promedio de 2.72 cm.

La respuesta anterior es contrastante con lo reportado por Jaskani *et al.* (2008) quienes obtuvieron proliferaciones de hasta 8 explantes, después de cuatro meses utilizando el mismo medio de cultivo. Por su parte Jamwal *et al.* (2013) utilizaron el cultivar Perlette, obteniendo a los 27 días una multiplicación de 3.33 explantes con una longitud promedio de 2.86cm, obteniendo brotes de la misma longitud, pero en un tiempo menor al nuestro, esto pudo deberse a la adición al medio MS+  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP+  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina.

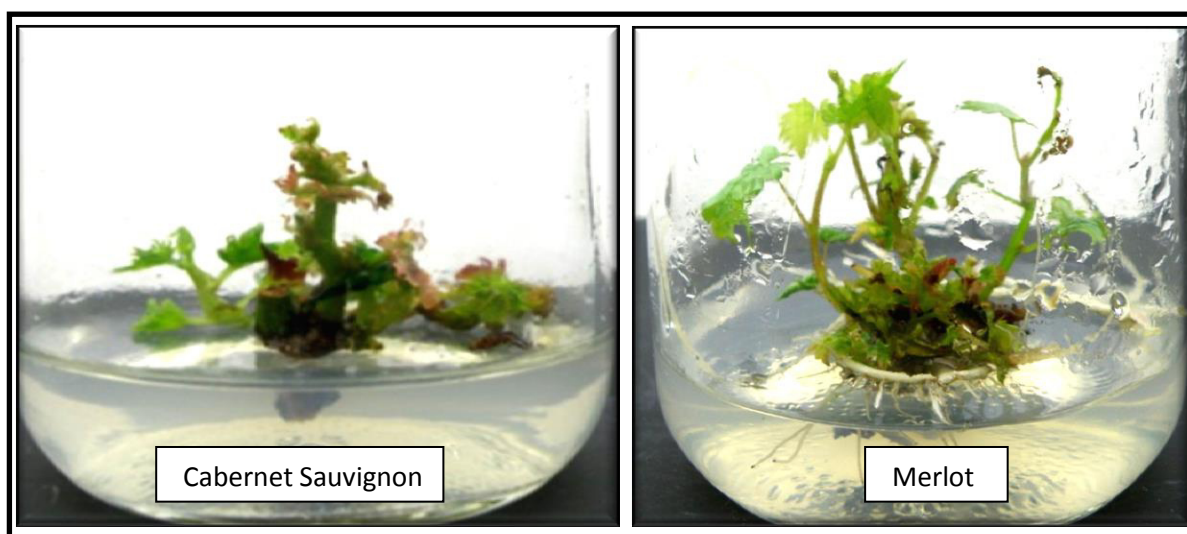


**Cuadro 13.** Comparación de medias en las variables número y longitud de brotes a las ocho semanas del subcultivo de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot.

Medios	Número Brotes	Longitud Brotes
M1 MS 50% + BAP 0.5	5.06b	2.34b
M2 MS 50% + BAP 1.0	6.37 <sup>a</sup>	2.72a
M3 WPM + BAP 0.5	4.37b	1.30b
M4 MS 100% + BAP 0.5	4.75b	1.72b
M5 MS 100% + BAP 1.0	4.87b	1.67b

† Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa. Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

\*Longitud en cm.



**Figura 11.** Respuesta de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot al medio de cultivo MS 50 % adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, después de 8 semanas del subcultivo.

En nuestro experimento los mejores resultados obtenidos fueron en el medio uno y la comparación de medias, fueron entre 4.06 y 3.81 (Cuadro 14), respectivamente, datos similares obtuvieron Mhatre *et al.* (2000) con variedades *Thompson* y *Tas-e-Ganesh*. Pero difiere mucho con lo obtenido con González *et al.* (2011), donde promedio enraizamiento por encima de las 10 utilizando reguladores como ANA y AIA con diferentes concentraciones. La media obtenida para la longitud de raíces, es muy semejante a la obtenida por Jamwal *et al.*, (2013) en donde obtuvieron un promedio de 1.78 pero en un tiempo de casi 6 semanas, esto al adicionar al medio MS, concentraciones de 0.5 a 8.0 mg L<sup>-1</sup> NAA (Figura 12).

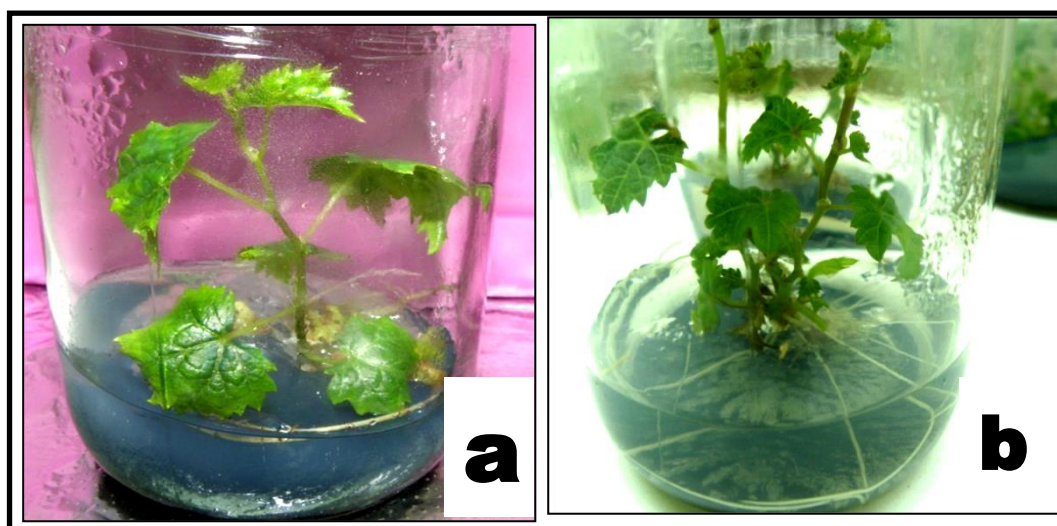
Mientras que, para la formación de raíces la respuesta inicio a partir de la segunda semana semejante a lo reportado por Raya *et al.* (2009) y González *et al.* (2011), donde el portainjerto “Saltcreek” y algunas variedades criollas iniciaron a partir del día 15 al 22. Pero diferente a lo obtenido con el portainjerto “Freedom” el cual inicio entre los 5 y 10 días. Esto se puede deber a las diferencias en la respuesta marcado por la variedad y genotipo de los cultivares (Ramming y Emershad, 1990; Pommer *et al.* 1995; Hewstone *et al.*, 2006).

**Cuadro 14.** Comparación de medias en las variables número y longitud de raíces a las ocho semanas de subcultivos.

Medios	Número Raíces	Longitud Raíces
M1 MS 50% + BAP 0.5	3.81 a	2.70a
M2 MS 50% + BAP 1.0	4.06 a	3.34a
M3 WPM + BAP 0.5	2.68b	0.78b
M4 MS 100% + BAP 0.5	3.00b	1.01b
M5 MS 100% + BAP 1.0	2.56b	1.31b
Media	3.22	1.83

†Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa. Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

\*Longitud en cm.



**Figura 12.** Inducción de raíces en los explantes, después de 8 semanas en el medio cultivo MS al 50% más 0.5 mg L<sup>-1</sup> y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. a) cultivar Merlot con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, b) cultivar Cabernet Sauvignon con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

### 4.3.2 Porcentaje de enraizamiento

La mejor respuesta de enraizamiento se obtuvo en el medio M1, teniendo el 100% de enraizamiento, mientras que el más bajo porcentaje se obtuvo en el medio M3 alcanzando solo el 50% (Cuadro 15). Estos resultados los podemos comparar con lo reportado por Jaskani *et al.* (2008), quienes obtuvieron únicamente de un 30 a 80% al incrementar la cantidad el AIB de 0.5 a 1.0 mg L<sup>-1</sup>. Por otro lado, se reportan porcentajes mayores al 80% al variar la cantidad de AIB (Nookaraju *et al.*, 2008;). Mukherjee (2010) obtuvo un porcentaje del 95% de raíces en el medio MS, con la adición de AIB y ANA. Por su parte, Abido *et al.* (2013) combinó ANA y AIB en medio MS, en la variedad *Muscat* de Alejandria, en diferentes concentraciones reportando porcentajes de formación de raíces del 50 al 73% promedio.

**Cuadro 15.** Porcentaje de enraizamiento de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot en los diferentes medios a las ocho semanas.

	Cabernet Sauvignon		Merlot	
	BAP (mg L <sup>-1</sup> )			
Medio	0.5	1.0	0.5	1.0
MS 50%	100	87.5	100	75
WPM	50	-----	62.5	-----
MS 100%	75	62.5	75	62.5

## 5. CONCLUSIONES

La técnica de desinfección utilizada fue adecuada para el establecimiento aséptico de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot de vid (*Vitis vinifera* L.)

La inducción de brotes se logró en el medio MS suplementado con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, El uso de meristemas produjo una mejor viabilidad yemas axilares en ambas especies,

La multiplicación de brotes *in vitro* para ambos cultivares se logró en el medio M2, así como, la proliferación y longitud de brotes. El enraizamiento *in vitro* se logró en los medios M1 y M2, permitieron la formación y desarrollo de raíces para ambos cultivares.

## 6. LITERATURA CONSULTADA

- Aazami, M.A. 2010. Effect of some growth regulators on *in vitro* culture of two *Vitis vinifera* L. cultivars. Romanian Biotechnological Letters. 15(3): 5229- 5232.
- Abido, A.I.A.; Aly, M.A.M., Sabah-Hassanem, A. and Rayan, G.A. 2013. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment. Middle-East Journal of Scientific Research. 13(3): 328-337.
- Afanador, A. 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemas de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Bogota, Colombia : Trabajo de grado. 112 p.
- Agüero, C., Viglioco, A. , Abdala, G., Tizio, R. 2000. Effect of gibberellic and unicazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. Plant Growth Regulation. 30:9-16.
- Albiac, M. 2015. La globalización del sector Agroalimentario y el sector Vitivinícola en Andalucía. Grado en Administración y Dirección en empresas y Derecho. Universidad de Sevilla. 14 p.
- Alcalde, A. 1989. Cultivares Vitícoals Argentinos. Mendoza: Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza INTA.
- Alizadeh, M., Singh, S.K. y Patel, V.B. 2010. Comparative performance of *in vitro* multiplication in four grape (*Vitis spp.*) rootstock genotypes. International Journal of Plant Production, 4(1): 41-50.

- Arvelo, F. 1998. La capacidad de los procesos industriales. Métodos estadísticos exigidos por las normas ISO 9000. Universidad Católica Andrés Bello. Caracas. 28p
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agron. Mesoam.
- Barba, A., Luna, B. y Romer, J. 2001. Micropropagación de Plantas. Trillas, 2001. 19-34p.
- Barreto M.S., Nookaraju A., Joglekar A.M., Karibasappam G.S., Agawal D.C. 2008. Variability among *Vitis vinifera* c.v, Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis. BMC Plant Biology 5 (20):1-7.
- Bernaldez, A.I. y Olguín, A. 2012. Breve historia del vino en México (Parte I): de la época prehispánica a principios de la revolución. Universidad Autónoma del Estado de México, 4 (3).
- Bessis, R., Charpentier, N., Hilt, C., Fournioux, J. 2000. Grape fruit set: Physiology of the abscission zone. Australian Journal of Grape and Wine Research 6, 125-130.
- Borja-Bravo, M.; García-Salazar, J.A.; Reyes-Muro, L. y Arrellano-Arciniega, S. 2016. Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*Vitis vinifera* L.) para mesa e industrial en Aguascalientes, México. Agricultura, Sociedad y Desarrollo. 13: 151-168.
- Boulton, R. 1999. El fenómeno de la copigmentación en los vinos tintos. Seminario Internacional hacia la enología del siglo XXI. EEA Mendoza: FCA(UNCuyo).
- Boutherin, D. y Bron, G. 1994. Multiplicación de plantas hortícolas. Zaragoza, Acribia.

- Casells, A. 1991. -Problems in Tissue Culture Contamination. U.S.A : Kluwer Academic Publishers. 479 p..
- Castro, D. 2005. Comunicación Personal. Medellín, Colombia : Universidad Católica de Oriente.
- Catania, C. y Avagnina. 2007. Curso Superior de Degustación de vinos. EEA Mendoza. INTA. 1-3 p.
- Cavazos M.T. 2012. Situación actual y bajo escenarios de cambio climático de la industria vitivinícola de Baja California, México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. Departamento de Oceanografía Física. 8-9pp.
- CFIV, 2016. Comisión de Fomento a la Industria Vitivinícola. Conclusiones mesas de trabajo vitivinícolas Nuevo León. [En línea]  
<http://www.cfiv.org.mx/conago/documentos>
- Chee, R., Pool, R.M. y Bucher, D. 1984. A method for large scale *in vitro* Propagation of *Vitis*. New York: New York's Food and Life Sciences Bulletin 109:1-9.
- Chee, R. y Pool, R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. Sci. Hortic., 32: 85-95.
- CMV. 2013. Consejo Mexicano Vitivinícola. Producto y Explotación, Asociación Nacional de Vitivinicultores A.C. [En línea]  
[http://www.uvayvino.org/sys/index.php?option=com\\_content&task=view&id=59&Itemid=80](http://www.uvayvino.org/sys/index.php?option=com_content&task=view&id=59&Itemid=80); Internet; accesado el 20 de octubre de 2015.
- CMV. 2014. Consejo Mexicano Vitivinícola. Estadísticas del vino en México. [En línea] [www.uvayvino.org/index.php/noticias/22-economia-y-mercados](http://www.uvayvino.org/index.php/noticias/22-economia-y-mercados). Accesado el 23 de mayo 2015.



- Columela, L.J.M. 1959. De re rustica. Traducc. C.J. Castro como los doce libros de agricultura. Ed. Iberia. Barcelona. 3: (2) 81-86.
- Consuelo, J., Varela, P. y Rey, M. 2006. Effect of benzyladenine concentration and double-phase culture system on *in vitro* multiplication of adult albariño plant. American Journal of Enology and Viticulture 57 (1):109-112.
- Coombe, B. 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. Australian Journal of Grape and Wine Research 1: 100- 110.
- Cruz, B.O. 2003. El Vino y el derecho: regulación jurídica de la producción, venta y consumo del vino en México. En: Anuario de historia del derecho. Instituto de investigadores jurídicos, UNAM, numero XV.
- Curhan G.C., Willett W.C., Rimm E.B., Spiegelman D., Stampfer M. 1996 Prospective study of beverage use and risk of kidney stones. American Journal of Epidemiology 143 (3): 240p.
- Debergh, P. y Read, P. 1991. Micropropagation Technology and Application. U.S.A. : Kluwer Academic Publishers. 479 p.
- Dessoky S. and Attia O. 2016. Microclonal propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Al-Bayadi. Crown in Taif, KSA. Int. Res. J. Biological Sci. 5(12) 24-27.
- Dettweiler, E., Patrice, T., y E. Rudolf. 2000. The “European network for grapevine genetic resources conservation and characterization”. XXVème Congres Mondial de la vigne et du vin (OIV). Section I. Viticulture. Paris. 19-23 Juin/June.
- Dixon, R. and Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell. 1085-1097.

- Ericksson, T. 1965. Studies on the growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.*, 18:976-993.
- Fernández-Portela, J. 2013. La evolución reciente del sector vitivinícola internacional. *GeoGraphos*. En línea. Alicante: Grupo Interdisciplinario de Estudios Críticos y de America Latina (GIECRY AL) de la Universidad de Alicante, vol 4 (39) 173-194. Revisado el 21 de Enero 1916.
- Fregoni, M. 2005. *Viticultura di Qualita*. Rivoli Veronese: Phytoline.
- Fuentes, S. y Chuquillanqui, C. 2003. Las enfermedades causadas por virus y su control. Lima, Perú : Centro Internacional de la papa.
- Gamborg, O., Miller, R. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151.
- George, E.F., Hall, M.A. y Klerk, G.J.D. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition Springer, p 175-204.
- Gil, G. 1997. *Fruticultura: el potencial productivo*. Santiago : Ediciones Universidad Católica de Chile. 342 p.
- Gil, G. 2000. *Fruticultura: la producción de fruta*. Santiago : Ediciones Universidad Católica de Chile. 582 p.
- González, E.; Pignataro, D.; Ojeda, G.; González, W.L. y Clark, D. 2011. Optimización de los medios de propagación y enraizamiento *in vitro* de las variedades criollas de vid para elaborar pisco. *Rev. Perú. Biol.* 18(3):361-366.
- Gribaudo, I., V. Novello and M. Restagno. 2001. Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. *Nebbiolo*). *Vitis* 40 (3), 137-140.

- Guta, I.C.; Visoiu, E.; and Bucumeanu, E.C. 2008. *In vitro* investigation of grapevine in the presence of virus infection (*V. vinifera* L., Feteasca Neagra cv). *Lucrari stiintifice: Science Horticultura*. 51: 775-778
- Hardie, W. and S. Aggenbach. 1996. Effects of site, season and viticultural practices on grape seed development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2, 21-24.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies F., Geneve R. 2002. *Plant Propagation, Principles and Practices*. New Jersey : 7a Ed. Prentice Hall, 880p..
- Hernández, Y. y González, M. 2010. Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *La Habana. Cuba : Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Volumen 31, N°4*.
- Hernández-Rendon, C.A.; Salazar-Marín, Y.; Restrepo-Betancur, L.F. 2013. Rescate de embriones para la obtención de vitroplantas de vid (*Vitis vinifera* L.). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15(2): 193-201.
- Hewstone, N.O., Valenzuela, J.B., Muñoz, C.S. 2006. Efecto de la variedad en el desarrollo de embriones in vitro de vides estenospermocárpicas. *Agríc. Téc.* 66(2):124-132
- Hicks, G and Dorey, M. 1988. Shoot multiplication growth and adventitious rooting in 3 cultivars of *Vitis*, *in vitro*. *Proc. Nova Scotian Inst. Sci.* 38: 83-89.
- Ibáñez A. 2004. Obtención de material vegetal libre de virus en uva de mesa de la región de Murcia y posterior micropropagación. *Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. Murcia, España. p.86*
- INE. 2008. Instituto Nacional de Estadística. [En línea] 2008. [www.ine.es/](http://www.ine.es/).

- Jaladet. M., Jubrael S. and Shymaa, H.A. 2009. Genetic diversity analysis of a number of grape ( *Vitis vinifera* L.) varieties in Kurdistan region Iraq using rapid markers. J. Duhok Univ. 12(1): 17-22
- Jamwal, M., Singh, B., Sharma, N., Kumar, R., Sharma, A., Sharma, R.M., Wali, V.K. and Parmar, A.M. 2013. *In vitro* Regeneration of Grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Perlette. World Journal of Agricultural Science 9(2): 161-166
- Jaskani, M., Abbas H., Sultana R., Khan M.M., Qasim M. and Khan I.A. 2008. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv Perlette. Pak. J.Bot.. 40(1): 105-109.
- Kartman, H. y Kester, E. 1995. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 4ª edición. México, Continental.
- Laslo, V., Zapartan, M. and Vicas, S. 2010. *In Vitro* respons of several cultivars of *Vitis vinifera* L. on media balanced phytohormone ratio. Research of Agricultural Science 42 (2):269-274.
- Lazo-Javalera, M.F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández M.E., Martínez-Tellez, M.A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A. and Rivera-Dominguez, M. 2016. Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. SpringerPlus. Sonora, México. 5, 453-461.
- Llyod, G. y McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int. Plant. Pop. Soc. Proc., 30: 421-427.
- López, L., Zanette, F., Kuchetscki, L., Guerra, M. 2005. Micopropagación de *Aspidosperma polyneuron* (*Peroba rosa*) a partir de segmentos de material juvenil. Brasil: Revista Árvore.

- Manzur, P. J. 2005. Eficiencia de la termoterapia y el cultivo de ápices *in vitro* en la limpieza de virus en vides (*Vitis vinifera* L.). Chile : Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal del Departamento de Fruticultura y Enología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Margara, J. 1988. Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Madrid : Mundi Prens, 283p.
- Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Karoglan, J.K. and Engelmann, F. 2013. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. Cent. Eur. J. Biol. 8(10): 993-1000.
- Márquez, J. A., Robles J.M., Armenta R.A., Valenzuela E. 2004. Diagnóstico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología en la cadena vid de mesa. Inifap. pp.28.
- Martínez de Toda, F. and Sancha, J.C. 1997. Caracterización ampélographique des cultivars blancs de *Vitis vinifera* L. conservés en Rioja. Bulletin de L'OIV (793-794), 221-234.
- Marulanda, M.; López, A.; Uribe, M. y Gutiérrez, L. 2010. Biodiversidad y biotecnología de la *Guadua angustifolia* Kunth. Risaralda (Colombia). Universidad Tecnológica de Pereira. 106 p.
- Mata-Rosas, M., Monroy- De la Rosa, M.A., Moebius-Goldammer, K. and Chávez-Avila, V.M. 2001. Micropropagación of *Turbinicarpus laui* glass et Foster, an endermic and endangered species. Estados Unidos de América : *In vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant. pp. 400-404.

- Mei-Chun, L. 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. Taiwan: Scientia Horticulturae. 107 (1), 64-69.
- Melyan, G.; Sahakyan, A. and Harutyunyan, A. 2015. Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) seedless cultivar Parvana through lateral bud development. Vitis, 54, 253-255.
- Mesa, U.M. 2001. Desarrollo de técnicas de propagación in vitro de vid (*Vitis vinifera* L.). Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Villalparaíso. Facultad de Agronomía. p. 60.
- Mhatre, M., Salunkhe, CK and Rao, PS. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. Scientia Horticulturae 84, 357-363.
- Mroginski, L, Sansberro, P. y Flascland, E. 2010. Establecimiento de cultivos Vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argenbio. INTA. 70-84p.
- Mukherjee, P. Husain, N. Misra, S.C. Rao V.S. 2010. *In vitro* propagation of a grape rootstock, de Grasset (*Vitis Champinii* Planch): Effect of medium compositions and plant growth regulators. Sci. Hort 126 (1): 13-19.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3), 473-497.
- Nitch, J. y Nitch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 163: 85-87.
- Nookaraju, A., Barreto, S. and Karibasappa, A.D.C. 2007. Synergistic effect of CPPU and benzyladenine on embryo rescue in six stenospermocarpic cultivars of grapevine. Vitis 46(4):188-191.

- Nookaraju, A., Barreto, S. and Agrawal, D. 2008. Rapid *in vitro* propagation of grapevine cv. Crimson Seedless— Influence of basal media and plant growth regulators. India : Journal of Applied Horticulure, 10(1): 44-49.
- Novaka, M., Janeiroa P., Serugab, M. and Oliveira-Brett, A.M. 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skin determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Anal. Chim. Acta. 630:107-115.
- OIV, 1992. Liste des synonymes des cépages de cuve. Groupe de Réglementation du vin et contrôle de la qualité. París. 72 pp.
- OIV, 2016. Organización Internacional de la Viña y el Vino. Coyuntura vitivinícola mundial 2015: evoluciones y tendencias. [En línea] Revisado Junio-5-2016. [www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/coyuntura-vitivinicola-mundial-2015-evoluciones-y-tendencias..](http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/coyuntura-vitivinicola-mundial-2015-evoluciones-y-tendencias..)
- Olmos, S.; Luciani, G. y Galdeano, E. 2010. Micropropagación. En: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hoop, E.; Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Buenos Aires, Argentina. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 352-362
- Ortiz, I. 2012. Atlas de los vinos del Mundo. Susaeta Publishing, Inc., ISBN.13:9788430556946, 264 pp.
- Osuna-Ávila, P. y Saucedo C. 2010. Propagación *in vitro* de vid variedad Globo Rojo. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez Chih. 32 p.
- Ozden, M. and Karaaslan, M. 2011. Effects of Cytokinin on Callus Proliferation Associated with Physiological and Biochemical Changes in *Vitis vinifera* L. Acta Physiol Plant. 33:1451-1459.

- Pascual, M. and Ferreira, E. 2007. Micropropagation of fig trees (*Ficus carica*). In Protocols for Micropropagation of Wood Trees and Fruit. Jain S.M., Haggman H. eds. Springer. Chapter 37: 409-416 p.
- Pérez, J. y Ramos, M. 2012. Establecimiento *in vitro* de *Abies guatemalensis* (Pinabete) a partir de embriones cigóticos. Zamorano. Honduras : Escuela Agrícola Panamericana.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Madrid Mundi-Prensa 326 p.
- Pinto-Sintra A.L. 2007. Establishment of embryogenic cultures and plant regeneration in Portuguese cultivar 'Touriga Nacional' of *Vitis vinifera* L. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 88: 121-126.
- Pommer, C.V., Ramming D.W. and Emershad, R.L. 1995. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size and culture date on in ovule embryo development and plant formation. Bragantia, Campinas. 54(2):237-249.
- Ponce, Ma. T., Agüero, C., Ocvirk, M. 2009. Efecto de la intensidad de poda en el desarrollo *in vitro* de emdriones de vides estenospermocárpicas. Rev. Fac. Cienc. Agrar. 51(1):45-53.
- Ramming, D.W. and Emershad, R.L. 1990. Embryo culture of early ripening seeded grape (*Vitis vinifera*) genotypes. HortSci. 25(3):339-342.
- Ramos-Amaya, J.E. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Especialización en Biotecnología Agraria. Bogota. 5-19p.



- Raya-Montaño, Y.A.; Villegas-Monter, A.; Arellano-Ostoa, G. 2009. Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. Revista Fitotecnia Mexicana. Chapingo, México. 32:111-117.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. New Hampshire, USA : 2a Edition. p. 375 p.
- Reynier, A. 2001. Manual de Viticultura. Madrid, España: Grupo Mundi Prensa 6° Edición.
- Rivera, C. y Devoto, L. 2003. Desarrollo Fenológico de 20 clones de *Vitis vinifera* Bloque Fundación Vivero AgroUC, Pirque. Trabajo de grado. Santiago : Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Rivero, M., Ramírez, V. y Sierralta, L. 2001. Tipo de explantes en el establecimiento *in vitro* de guanabano (*Annona murcata* L.). Rev. Fac. Agron. (Luz), 18:258-265.
- Roa, M. y Torres, A. 2012. Desarrollo de un protocolo para la introducción *in vitro* de *Vitis vinifera* Var. Cabernet Sauvignon. Bogota : Trabajo de grado para título de Ing. Agronomo. Universidad de ciencias aplicadas y ambientales. 54 pp.
- Roca, W. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Colombia : CIAT. 946p.
- Rodrigo, C.A.; Azcarrunz, M.E.; Quezada. J. 2006. Microinjerto *in vitro* de vid (*Vitis vinifera*). Biofarbo. 15: 43-49.
- Rodríguez, A. y Carvajal, A. 2009. Cultivos de Tejidos. Bogota, D.C. Colombia : Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Sabogal, H. 2007. Guía de Vino Carrefour. Ed. LEGIS. 24 p

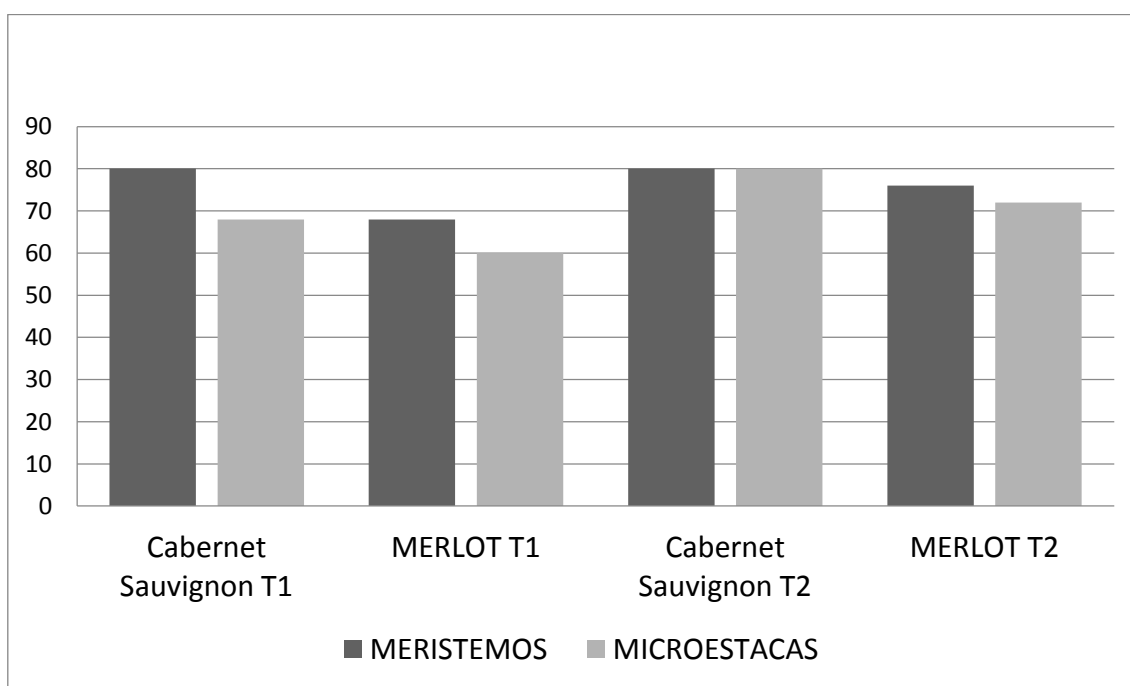
- SAGARPA. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [En línea] 2011. [www.uva.gob.mx](http://www.uva.gob.mx).
- Salazar, D.M. 1985. La vinífera Bobal y su preselección clonal-sanitaria. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 427 pp.
- Salazar, D. y Melgarejo, P. 2005. Viticultura. Técnica de cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos. Madrid : MundiPrensa. 325 p.
- Salazar, R. 2010. Historia del cultivo de tejidos vegetal. [En línea] 2010. [Citado el: 29 de Diciembre de 2014.] [www.calameo.com/subcritions/632868](http://www.calameo.com/subcritions/632868).
- Salisbury, F. y Ross, C. 1994. Fisiología Vegetal. México D.F. : Grupo Editorial Iberoamérica, S.A.. Cuarta Edición.
- Seemann, B. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Ed. Universitaria. 230p.
- Shirikhande, A.J. 2000. Wine by-products with health benefits. Food Res. Internat. 33:469-474.
- SIAP, 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción Agrícola cíclicos y perennes 2015, modalidad riego + temporal de uva. [En línea] [http://infosiap.siap.gob.mx/agricola-siap\\_gb/.cultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/agricola-siap_gb/.cultivo/index.jsp)
- Singh, N., Singh, S. and Singh, A. 2011. Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions. Journal of Grapevine Research. 50(3): 115-118.

- Singh, S., Khawale, R. and Singh, S. 2004. Technique for rapid *in vitro* multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79(2): 267-272.
- Suárez, F. 2011. Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Thomas, P and Ravindra, M. 1997. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factor, season and decontamination treatment on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. Journal of Horticultural Science 72: 713-722.
- Thomas, P. 1998. Humid incubation period and plantlet age influence acclimatization and establishment of micropropagated grapes. *In vitro* cell. 52-56.
- Thomas, P. and Schiefelbein, J. 2001. Combined *in vitro* and *in vivo* Propagation for Rapid Multiplication of Grapevine cv. *Arka Neelamani*. HortScience, 2001. Vols. 36(6): 1107-1110.
- Thomas, P. and Prakash, G. 2004. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. Bangalore, India : *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 40: 603-607.
- Tobar, C. 2011. Totipotencialidad. [En línea] 2011. [Citado el: 21 de Diciembre de 2014.] <http://www.buenastareas.com/ensayos/totopotencialidad/1499061.html>.
- Valdez, J.G. 2005. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after and extended period of seed trace culture. Vitys. 44(1):17-23.
- Vargas, M. y Abdelnour, A. 2010. Cultivo *in vitro* a partir de Embriones Cigóticos. Anatomía Mesoamericana 21(1): 73-83.

- Villalobos, M. V. y Engelmann, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germoplasma using biotechnology. México : World Journal of microbiology and biotechnology. 11: 375-382.
- Villamizar, E. 2005. Estandarización del protocolo *in vitro* para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y de Rodamonte (*Escallonia myrtilloides*) en el laboratorio de cultivos de tejidos del Jardín Botánico José Celestino Mutis de Bogotá. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Cúcuta. Norte de Santander.
- Vivai Cooperativi Rauscedo. 2013. Catálogo General de las Variedades y Clones de Uva de Vino y de Mesa. Italia 74-76.
- Waterhouse A. 1994. Wine antioxidants may reduce heart disease and cancer. Presentation at American Chemical Society, Washington, DC, August.

## 7. APÉNDICE

**Cuadro 1A.** Comparativo de porcentaje de viabilidad las cuatro semanas.



**Cuadro 2A.** Efecto del NaClO a diferentes tiempos para medir la contaminación y viabilidad en porcentaje según el explante.

		<u>Contaminación</u>				<u>Viabilidad</u>			
		3 Semanas		4 Semanas		3 Semanas		4 Semanas	
	Explante	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Cabernet									
Sauvignon	Meristemo	16	12	20	20	84	88	80	80
Merlot	Meristemo	24	12	32	20	76	88	68	80
Cabernet									
	Yemas								
Sauvignon	Axilares	28	16	32	24	72	84	68	76
Cabernet									
	Yemas								
Merlot	Axilares	32	24	40	28	68	76	60	72

**Cuadro 3A.** Prueba de Ji-Cuadrada y significancia para las variables contaminación y viabilidad a las cuatro semanas.

Explante	Días	<u>Cabernet Sauvignon</u>				<u>Merlot</u>			
		T1		T2		T1		T2	
		X <sup>2</sup>	Sig.	X <sup>2</sup>	Sig.	X <sup>2</sup>	Sig.	X <sup>2</sup>	Sig.
Meristemo	10	1.33	0.248	1.19	0.275	1.33	0.248	1.19	0.275
Yemas Axilares	10	0.051	0.822	0.056	0.812	0.298	0.585	0.508	0.476

- Variables independientes

**Cuadro 4A.** Inducción de brotes en el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP las 8 semanas de subcultivos.

Medio	Número De Brotes	Longitud de Brotes
M1 MS + 1.5 BAP	1.75 <sup>ab</sup>	1.74 <sup>b</sup>
M2 MS + 1.0 BAP	2.38 <sup>a</sup>	2.45 <sup>a</sup>
M3 MS + 0.5 BAP	1.50 <sup>b</sup>	1.78 <sup>b</sup>

**Cuadro 5A.** Datos para la Inducción de yemas axilares para número de brotes, longitud de brotes y número de hojas para la cultivar Cabernet Sauvignon a las 8 semanas.

<b>Medio</b>	<b>1</b>						
Muestra	1	2	3	4	5	6	%
Núm. Brotes	2.0	1.0	2.0	3.0	2.0	1.0	<b>1.83</b>
Long. Brotes	2.4	2.7	1.8	1.8	2.4	1.9	<b>2.16</b>
Núm. de hojas	2.0	2.0	1.5	1.7	2.5	2.0	<b>1.94</b>

<b>Medio</b>	<b>2</b>						
Muestra	1	2	3	4	5	6	%
Núm. Brotes	3.000	2.000	4.000	4.000	3.000	1.000	<b>2.833</b>
Long. Brotes	2.067	2.550	1.950	1.875	2.067	3.400	<b>2.318</b>
Núm. de hojas	1.667	2.000	1.500	1.333	2.333	3.000	<b>1.972</b>

<b>Medio</b>	<b>3</b>						
Muestra	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	%
Núm. Brotes	4.0	1.0	3.0	3.0	3.0	2.0	<b>2.67</b>
Long. Brotes	2.1	2.1	2.0	1.8	2.2	2.1	<b>2.04</b>



**Cuadro 6A.** Datos para la Inducción de yemas axilares para número de brotes, longitud de brotes y número de hojas para la cultivar Merlot a las 8 semanas.

<b>Medio</b>	<b>1</b>						
Muestra	1	2	3	4	5	6	%
Núm. Brotes	2	1	2	1	2	1	<b>1.5</b>
Long. Brotes	2.05	2.3	1.9	2	2.4	2.4	<b>2.175</b>
Núm. de hojas	2	2	1.5	1.5	1.5	2	<b>1.75</b>

<b>Medio</b>	<b>2</b>						
Muestra	1	2	3	4	5	6	%
Núm. Brotes	2	2	2	2	2	1	<b>1.83333</b>
Long. Brotes	2.4	2.55	1.8	2.4	2.3	3.1	<b>2.425</b>
Núm. de hojas	2	1.5	1.5	1.5	2	1	<b>1.58333</b>

<b>Medio</b>	<b>3</b>						
Muestra	1	2	3	4	5	6	%
Num Brotes	1	2	1	1	2	2	<b>1.5</b>
Long. Brotes	2.4	1.95	1.8	2.8	2.25	2.3	<b>2.25</b>